



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

Estudio del efecto de la adición de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta de cerdas lactantes sobre su actividad inhibitoria del crecimiento de enterobacterias en la cerda y en los lechones.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

LORENA FUENTES HERNÁNDEZ

ASESORES: DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

DR. JOSÉ ABEL CIPRIAN CARRASCO

DR. JOSÉ ANTONIO RENTERÍA FLORES



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES
ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Estudio del efecto de la adición de Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis y Saccharomyces cerevisiae en la dieta de cerdas lactantes sobre su actividad inhibitoria del crecimiento de enterobacterias en la cerda y en los lechones.

que presenta la pasante: Lorena Fuentes Hernández
con número de cuenta: 40301371-3 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de Septiembre de 2009.

PRESIDENTE MVZ. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

SECRETARIO Dr. Andrés Romero Rojas

PRIMER SUPLENTE Dra. Gabriela Bárcenas Morales

SEGUNDO SUPLENTE MC. Ana Laura Vázquez Martínez

AGRADECIMIENTOS

*A la **FES Cuautitlán**, que me dio la oportunidad de ser parte de una generación más de QFB's, ya que jamás me imagine pertenecer a la **UNAM**, entré a esta maravillosa facultad sin saber a lo que me enfrentaría, pero gracias por todo lo que me ofrecieron, sus maestros, sus aulas y laboratorios donde me enseñaron a crecer y ser responsable.*

*A mi asesora **Dra. Susana Mendoza Elvira** por permitirme trabajar en su laboratorio e integrarme al proyecto y asesorarme en mi tesis y durante mi estancia en el, además de su tiempo valioso invertido en este trabajo, pero sobre todo gracias por la confianza que me brindó, su amistad y la buena armonía que siempre hubo en el laboratorio, muchas Gracias.*

*Al **Dr. Abel Ciprian Carrasco**, gracias por asesorarme en la organización de resultados y su interpretación, Gracias.*

*Al **Dr. José Antonio Rentería Flores** y al **MC. Alejandro Castellanos Aceves** por permitirme formar parte de su proyecto, y facilitarme las muestras, sin estas no hubiera realizado este trabajo.*

*A mis sinodales **MVZ. Gerardo Cruz Jiménez, Dr. Andrés Romero Rojas, Dra. Gabriela Bárcenas Morales** y **MC. Ana Laura Vázquez Martínez**, por su tiempo invertido en la revisión de mi tesis y su asesoramiento para mejorar la calidad de mi trabajo. Gracias.*

*Al **Dr. Eliseo Hernández Baumgarten** por sus recomendaciones bibliográficas, y su disponibilidad para asesorarme, Gracias.*

*Al **MVZ. David Trujillo Cevallos** por su asesoría técnica, y por su agradable compañía durante mi estancia en el laboratorio.*

*Al Señor **Gabino Sánchez** por apoyarme dentro del laboratorio, proporcionándome el material necesario para el proyecto, además le doy gracias por su amistad y todos los momentos gratos en el laboratorio.*

*A mis amigos de laboratorio **Clau, Moni, Erika, Ara, Zareth, Carlitos** por apoyarme en el laboratorio, sin ustedes creo que no habría podido sola con el trabajo, fue demasiado, pero sobre todo por su amistad por cuidarme, aconsejarme y alentarme para terminar con este reto más.*

A mis papas **Eliza y Pedro** por darme la vida y porque sin su apoyo moral y económico jamás habría terminado, no se imaginan cuanto les agradezco la oportunidad que me han dado para estudiar y tener una profesión y espero no haberlos defraudado, gracias por su cariño, comprensión sobre todo por la confianza que depositaron en mí, yo sé que me tarde un poquito, pero al fin terminé, LOS QUIERO MUCHO.

A mi hermana **Marlen** por su apoyo incondicional, por cuidarme, por estar conmigo cuando lo necesito, por escucharme, por entenderme, por soportarme, por regalarme cosas, gracias por tu cariño TE QUIERO MUCHISIMO.

A mis hermanitas **Anna y Mabel**, gracias porque ustedes, han sido mi fuente de inspiración, y también les agradezco que me hayan soportado durante estos añitos, LAS QUIERO MUCHO.

A ti **Corazón** por tenerme paciencia, cuidarme y estar a mi lado cuando me sentí mal, por hacer que no extrañara tanto a mis familia, pues ibas a visitarme, por ayudarme con mis apuntes y sobre todo por quererme tanto como yo a ti, TE QUIERO .

A mi familia, mis abuelitos **Lupita, Leandro y Martin, mis tías, tíos, primos**, porque todos ustedes creen en mí, y yo sé que me quieren mucho, al fin soy la nieta, sobrina o prima mayor.

A mis amigos que conocí durante estos años en la facultad, principalmente a ti **Miguel (mijo)** por tu apoyo incondicional, gracias por ser como mi hermano, por cuidarme y estar siempre al pendiente de mí, por escucharme, te acuerdas como comenzó nuestra amistad.... media extraña no te parece, créeme que sin tu ayuda me hubiera sentido media perdida. A ti **Marisol** por estar conmigo, por cuidarme, por brindarme tu amistad, y no te imaginas cuanto me apoyaste cuando tomamos clases juntas, gracias por ser una buena amiga. **Lupita** tu también haz sido una de mis mejores amigas, gracias por apoyarme y ayudarme con algunas materias, me gusta que siempre estés sonriendo, y hechando relajo con **Noemi**, que es otra amiguita muy divertida, agradable y buena persona, gracias por ser mis amigas. **Marduck** gracias por ayudarme cuando lo necesite, por tu amistad y por ese sentido del humor que hacían más amenas las clases en el laboratorio. También a **Maribel y Ariana** que las conocí desde primer semestre, gracias por sus consejos, por ayudarme y por enseñarme que leer es una actividad que enriquece el alma y la mente. En general gracias a todos mis compañeros de generación, **Emma, Yusvi, Itzmel, luz**, etc., cada uno forma parte de mi formación profesional.

DEDICATORIAS

*Esta tesis va dedicada a mis papas **Eliza y Pedro** que son las personas más importantes en mi vida, pues me han dado la vida y me han enseñado que la educación es muy importante, y siempre han creído en mi, ustedes son los responsables de que yo esté aquí y por ustedes me he esforzado, y sé muy bien que este es un sueño que compartimos y por el cual he luchado, deseo con todo mi corazón que les guste, y no olviden que los **AMO**.*

*A mis hermanas **Marlen, Anna Livia y Eliza Mabel**, también les dedico este trabajo, porque ustedes también forman parte muy importante de esta familia, y de mi vida, cuando decidí estudiar esta carrera lo hice pensando en ustedes, porque para mí son mis hermanitas chiquitas (aunque no tan pequeñas) y las niñas más lindas que existen, **LAS QUIERO MUCHO**.*

*También está dedicado a **mi Familia**, mi novio **Arturo** y todas aquellas personas que me quieren y creen en mí.*

Con Cariño

LORENA

***Largo es el camino de la enseñanza por medio de teorías;
breve y eficaz por medio de ejemplos.***

Séneca

INDICE GENERAL

	Página
INDICE GENERAL	I
INDICE DE TABLAS	IV
INDICE DE GRÁFICAS	VII
INDICE DE FÍGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	X
1.0 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Probiótico	2
1.1.1 Composición	3
1.1.2 Mecanismo de acción	5
1.1.3 Potencia	7
1.1.4 Viabilidad y números	8
1.1.5 Características de un buen probiótico	10
1.2 Antecedentes	
1.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.2.2 <i>Bacillus</i>	16
1.3 Uso de probióticos en cerdos	20
1.4 Colonización bacteriana del tracto gastrointestinal	22
1.5 El cerdo como especie productiva	24
1.6 Importancia del destete	25
1.7 JUSTIFICACIÓN	26
2.0 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivos Particulares	27

3.0 MATERIAL Y MÉTODOS	28
3.1 FASE 1	
3.1.1 Sitio experimental	28
3.1.2 Dietas experimentales	28
3.1.3 Animales	28
3.1.4 Cultivos bacterianos de contenido fecal	29
3.2 FASE 2	
3.2.1 Dietas experimentales	31
3.2.2 Animales	31
3.2.3 Cultivos bacterianos de contenido fecal	31
3.3 DIAGRAMAS DE FLUJO	33
4.0 RESULTADOS	42
5.0 DISCUSIÓN	47
6.0 CONCLUSIONES	52
7.0 ANEXO	53
7.1 Tablas del contenido de dietas para la alimentación de cerdos y lechones en Experimentación	53
7.2 Tablas de cuantificación e identificación de bacterias aerobias y anaerobias en heces fecales determinados a través de cultivos bacteriológicos en cerdos hembra y lechones durante la lactancia y después del destete	55

7.2.1	Tablas de resultados de cerdos hembra del día 0 y 28 tratados con las diferentes dietas	56
7.2.2	Tablas de resultados de lechones del día 0, 14 y 28 durante la lactancia tratadas con las diferentes dietas	62
7.2.3	Tablas de resultados de lechones destetados durante las 3 fases de Alimentación	71
8.0	BIBLIOGRAFÍA	77

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Especies bacterianas y levaduras comúnmente empleadas para la elaboración de probióticos	4
Tabla 2. Proporciones de vitaminas que contiene <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
Tabla 3. El numero más probable para series de diluciones en replicas de cinco por nivel de dilución (Woomer 1994)	36
Tabla 4. Cuantificación e Identificación general de bacterias aerobias y anaerobias en cerdas y lechones	46
Tabla 5. Dieta administrada a las cerdas durante la lactancia	53
Tabla 6. Dieta administrada a los lechones destetados fase 1	54
Tabla 7. Dieta administrada a los lechones destetados fase 2	54
Tabla 8. Dieta administrada a los lechones destetados fase 3	55
Tabla 9. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de cerdos hembra del día 0 durante la lactancia, bloque 1 (Fecha: 15/11/07)	56
Tabla 10. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de cerdos hembra del día 0 durante la lactancia, bloque 2 (Fecha: 19/12/07)	57
Tabla 11. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de cerdos hembra del día 0 durante la lactancia, bloque 3 (Fecha: 22/01/08)	58
Tabla 12. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de cerdos hembra del día 28 durante la lactancia, bloque 1 (Fecha: 07/12/07)	59
Tabla 13. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de cerdos hembra del día 28 durante la lactancia, bloque 2 (Fecha: 17/01/08)	60
Tabla 14. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de cerdos hembra del día 28 durante la lactancia, bloque 3 (Fecha: 20/02/08)	61

Tabla 15. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 0, “isopo” durante la lactancia, bloque 1 (Fecha: 15/11/07)	62
Tabla 16. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 0, “isopo” durante la lactancia, bloque 2 (Fecha: 19/12/07)	63
Tabla 17. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 0, “isopo” durante la lactancia, bloque 3 (Fecha: 22/01/08)	64
Tabla 18. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 14, durante la lactancia, bloque 1 (Fecha: 30/11/07)	65
Tabla 19. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 14, durante la lactancia, bloque 2 (Fecha: 17/01/08)	66
Tabla 20. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 14 durante la lactancia, bloque 3 (Fecha: 06/01/08)	67
Tabla 21. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 28 durante la lactancia, bloque 1 (Fecha: 07/12/07)	68
Tabla 22. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 28 durante la lactancia, bloque 2 (Fecha: 17/01/08)	69
Tabla 23. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 28 durante la lactancia, bloque 3 (Fecha: 06/01/08)	70
Tabla 24. Cuantificación e Identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones destetados de la 1° fase del primer bloque (Fecha: 20/02/08)	71

Tabla 25. Cuantificación e Identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones destetados de la 2° fase del primer bloque (Fecha: 04/03/08)	72
Tabla 26. Cuantificación e Identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones destetados de la 3° fase del primer bloque (Fecha: 11/03/08)	73
Tabla 27. Cuantificación e Identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones destetados de la 1° fase del segundo bloque (Fecha: 17/01/08)	74
Tabla 28. Cuantificación e Identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones destetados de la 2° fase del segundo bloque (Fecha: 11/02/08)	75
Tabla 28. Cuantificación e Identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en lechones destetados de la 3° fase del segundo bloque (Fecha: 11/002/08)	76

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.	Cantidad de bacterias totales (Unidades formadoras de colonias log/gramo de materia fecal) desde el nacimiento a 120 días	23
Gráfica 2.	Evolución de bacterias aerobias y anaerobias en heces de lechones del nacimiento al día 120 de edad	23
Gráfica 3.	Promedio de bacterias totales (UFC log/g de heces determinadas en cerdos hembra tratados con los probióticos <i>S. cerevisiae</i> , <i>B. subtilis</i> - <i>B. licheniformis</i> o la combinación de ambos durante la lactancia en los días 0 y 28 comparadas con un grupo control	42
Gráfica 4.	Promedio de bacterias totales (UFC log/g de heces determinadas en lechones tratados con los probióticos <i>S. cerevisiae</i> , <i>B. subtilis</i> - <i>B. licheniformis</i> o la combinación de ambos durante la lactancia en los días 14 y 28 comparadas con un grupo control	43
Gráfica 5.	Promedio de bacterias totales (UFC log/g de heces determinadas en lechones destetados tratados con los probióticos <i>S. cerevisiae</i> , <i>B. subtilis</i> - <i>B. licheniformis</i> o la combinación de ambos durante las diferentes fases de alimentación comparadas con un grupo control	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Levaduras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
Figura 2. Colonias de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
Figura 3. Colonias de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus licheniformis</i> en medio de cultivo	16
Figura 4. Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i>	19
Figura 5. Obtención de muestras fecales para cultivos bacterianos en fase 1	30
Figura 6. Obtención de muestras fecales para cultivos bacterianos de la fase 2	32
Figura 7. Diagrama de flujo a seguir para las muestras de heces fecales llegadas al Laboratorio	33
Figura 8. Diagrama de flujo para técnica de el Número Más Probable	34
Figura 9. Cuantificación de microorganismos mesófilos aerobios por conteo en placa a 25 y 37 °C	37
Figura 10. Identificación de microorganismos anaerobios en agar sangre y agar soya Trypticaseína	38
Figura 11. Diagrama de flujo de tinción de Gram	39
Figura 12. Identificación de especies de Enterobacterias	40
Figura 13. Diagrama de flujo para la identificación de especies del genero <i>Bacillus</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AMC=	Agar Mc Conkey
AS=	Agar Sangre
AST=	Agar Soya Trypticaseina
<i>B. brevis</i>=	<i>Bacillus brevis</i>
<i>B. cereus</i>=	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. colistenus</i>=	<i>Bacillus colistenus</i>
<i>B. licheniformis</i>=	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>B. polimixa</i>=	<i>Bacillus polimixa</i>
<i>B. subtilis</i>=	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. toyoi</i>=	<i>Bacillus toyoi</i>
<i>E. coli</i>=	<i>Escherichia coli</i>
g=	Gramo
<i>L. lactis</i>=	<i>Lactococcus lactis</i>
log=	Logaritmo
mg=	Miligramo
mL=	Mililitro
µl=	Microlitro
µm=	Micrometro
NaCl=	Cloruro de sodio
NMP=	Número más probable
RT-PCR=	Transcripción Reversa de Reacción en Cadena de la Polimerasa
SC=	Sin crecimiento
<i>S. cerevisiae</i> =	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. cholerae sui</i>=	<i>Salmonella cholerae sui</i>
<i>S. thyphimuriums</i>=	<i>Salmonella thyphimuriums</i>
T1=	Dieta control
T2=	Dieta con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T3=	Dieta con <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Bacillus licheniformis</i>
T4=	Dieta con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> + <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Bacillus licheniformis</i>
UFC=	Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

Los probióticos son microorganismos vivos generalmente bacterias pero también levaduras que cuando son ingeridas vivas en cantidades suficientes tienen un efecto positivo en la salud que van más allá de los efectos nutricionalmente conocidos. Los probióticos pueden operar a través de un efecto nutricional y terapéutico, previniendo diarreas y modulando la inmunidad.

Los cerdos son animales ideales para que se les administren probióticos, ya que su microflora intestinal está ampliamente compuesta por bacterias ácido lácticas, además de que los lechones son víctimas de graves infecciones causadas por bacterias enterotoxigénicas en las primeras semanas de vida y estas pueden incluso causarles la muerte.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*-*Bacillus licheniformis*, así como la combinación de ambos en la dieta de cerdas lactantes y lechones durante la lactancia y al destete, observándose un efecto de inhibición de enterobacterias, incrementando la resistencia a agentes patógenos (*Escherichia coli*), ejerciendo un balance de la microflora intestinal, estimulando directamente el sistema inmune y disminuyendo así la frecuencia de diarreas en las cerdas y los lechones durante la lactancia y al destete. Las condiciones de equilibrio en la salud de los animales son más factibles a conservarse con la administración de este producto.

La investigación de estas propiedades permitirá optimizar los procesos de elaboración de alimentos funcionales que contengan este tipo de cultivos, así como conocer los mecanismos por los cuales estas bacterias ejercen su efecto benéfico en el hospedador, lo que ayudará a la comunidad veterinaria y el público en general, con el uso de estos probióticos que se encuentran en el mercado de alimentos.

1.0 INTRODUCCIÓN

Los lechones al nacer quedan expuestos a los microorganismos del ambiente que les rodea, y además entran en contacto con las heces maternas que contienen bacterias que colonizan su tracto digestivo. Estas bacterias buscan un nicho adecuado, donde compiten e interaccionan entre sí, constituyendo finalmente una población relativamente estable y compleja que representa la microflora intestinal normal del lechón. No obstante, esta estabilidad puede ser alterada por cambios dietéticos o ambientales importantes (Radecki y Yokoyama, 1991; Conway, 1994; Jensen, 1998).

En el tracto gastrointestinal se encuentra normalmente un gran número de especies de bacterias comensales y patógenas; sin embargo, cuando se incrementa la cantidad de microorganismos patógenos se pueden producir alteraciones de la salud y muerte (Camacho, 1999).

Las principales formas de control de enfermedades entéricas se basan en el uso de antibióticos vía alimento; no obstante, su uso prolongado puede generar resistencia en cierto tipo de bacterias patógenas. Esto no sólo reduce el número de antimicrobianos disponibles en la industria para el control de infecciones bacterianas, sino que esta resistencia incrementa el riesgo para la salud humana (Mathew et al., 1998; Sala, 1992).

Los problemas entéricos, especialmente en lechones, son una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria porcina. La totalidad de las granjas porcinas utiliza antibióticos de manera terapéutica y subterapéutica para controlar estos problemas, pero se debe incidir en la búsqueda de otros aditivos, que ofrezcan mejores o similares beneficios que los antibióticos y que a su vez no sean perjudiciales para los animales ni el hombre (Close, 2000; Sala, 1992).

El uso de los probióticos como promotores del crecimiento ha ido ganando terreno en la producción porcícola en los últimos años, esto debido a la tendencia de los países industrializados, especialmente los europeos, a disminuir e incluso prohibir el uso de los antibióticos como aditivos promotores. Existen en el mercado numerosas opciones de este tipo de productos, algunas

basadas en hongos como la levadura *Sacchararomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) y otros basados en bacterias tales como *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, etc. (Solorio, 2007)

El papel de los microorganismos en la alimentación en animales y humanos no es reciente, data de 1908, cuando Metchnikoff sugiere que el consumo de *Lactobacillus* del yogurt puede relacionarse con incremento en la longevidad del hospedador (Holzapfel, 2001).

Un probiótico se define como: “Un suplemento alimenticio que contiene microorganismos que ayudan en la protección en contra de una invasión por microorganismos patógenos que puedan afectar la nutrición y el crecimiento del animal.

1.1 PROBIÓTICOS

El término probiótico fue utilizado por Parker (1974) para describir organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal; se trata de productos que están hechos a base de microorganismos vivos y que se utilizan como aditivos en la alimentación animal en vistas de un mejoramiento de la higiene digestiva y los rendimientos zootécnicos. Esta definición puede abarcar los cultivos, las células y los metabolitos microbianos; en este último grupo se puede incluir preparaciones de antibióticos comerciales (García, 1995)

Los probióticos han sido señalados como posibles reemplazos de los antibióticos. Estos han sido definidos como microorganismos vivos que ejercen un efecto benéfico para el tracto intestinal del hospedero, manteniendo y reforzando los mecanismos de defensa ante patógenos sin perturbar las funciones fisiológicas y bioquímicas normales (Fuller, 1989).

Probiótico se origina de dos palabras griegas que significan “por la vida” y contrasta con el término antibiótico que quiere decir “contra la vida” (Solís, 1991). Paradójicamente el efecto de los probióticos tal vez depende de la actividad antibiótica de la bacteria en el probiótico (García, 1995)

Al parecer los probióticos tienen como ventaja optimizar el proceso de digestión porque estimulan la flora natural existente, ya que cualquier proceso de digestión o fermentación se lleva a cabo por microorganismos. Al adicionar un producto hecho a base de productos naturales, se favorece enriqueciendo la flora intestinal o digestiva presente, con los resultados óptimos de una mejor digestión, un mejor aprovechamiento de la ración, una mejor asimilación de los nutrientes, que se reflejan en beneficios a diversos niveles en los animales.

Diversos autores han reportado que dichos beneficios se pueden conceptuar, en el caso de los animales de engorda en una mayor ganancia de peso; en animales productores de leche en una mayor producción con alto porcentaje de grasa; en cerdos reducción drástica de diarreas, menor mortalidad, mayor ganancia de peso, en una mejor condición de salud en general del animal.

1.1.1 COMPOSICIÓN

Los probióticos pueden ser presentados a los animales y en humanos en varias formas. El tipo de preparación dependerá del uso que se le designe. Así, probióticos pueden ser incluidos en forma de pellets, cápsulas, pasta, polvo o gránulos los cuales pueden ser dosificados directamente al animal o administrados a través del alimento. Las especies blanco son vacunos, borregos, cabras, cerdos, aves de corral, caballos y animales domésticos (Fuller, 1989).

Comúnmente, la mayoría de los probióticos contienen una o varias especies de los géneros *Lactobacillus* y/o *Streptococcus* y algunos cuantos contienen *Bifidobacterium*. Las preparaciones de probióticos pueden consistir de cepas simples o mezclas de estas. La ventaja de preparaciones de cepas múltiples es que son activas contra un amplio margen de condiciones y especies animales. La Tabla 1 muestra las especies que comúnmente están siendo usadas en la preparación de probióticos.

Lactobacillus bulgaricus
Lactobacillus acidophilus
Lactobacillus casei
Lactobacillus farciminis
Lactobacillus helvericus
Lactobacillus lactis
Lactobacillus salivarius
Lactobacillus plantarum
Lactobacillus rhamnosus
Pediococcus acidilactici
Streptococcus infantarius
Streptococcus thermophilus
Enterococcus faecium
Enterococcus faecalis
Bifidobacterium sp.
Bacillus subtilis
Bacillus licheniformis
Bacillus cereus var. Toyoi
Sacharomyces cerevisiae
Kluyveromyces

Tabla 1. Especies bacterianas y levaduras comúnmente empleadas para la elaboración de probióticos.

Lactobacillus y *Streptococcus* son los grupos más comúnmente empleados en la preparación de probióticos. La justificación del uso de *Lactobacillus* proviene de estudios que muestran el desarrollo de la flora intestinal desde el nacimiento hasta que los patrones alimenticios son similares a los del adulto. A medida que se incrementa la población de *Lactobacillus*, otros componentes de la flora decrecen. Experimentos con pollos gnotobióticos han confirmado que los lactobacilos ejercen un efecto de control sobre *E. coli*. Resultados similares han sido obtenidos en cerdos destetados a los días de nacidos en cuya dieta sustitutiva se incluyó *Lactobacillus* en la leche (Apella, 1992; Hekmat, 1992; Nader, 1992).

Aunque algunos probióticos contienen *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) y *Bacillus cereus* (*B. cereus*) como uno de sus componentes, es difícil ver como este organismo pudiera ser activo en el intestino, pues no es de origen intestinal y es aerobio estricto, pudiendo no ser siquiera capaz de crecer.

Otros componentes comúnmente empleados para la elaboración de probióticos en el mercado nacional, incluyen vitaminas, carbonatos, leche en polvo, acidificantes, etc. (De cupere, 1992; Muñoz, 1984).

1.1.2 MECANISMO DE ACCIÓN

La hipótesis del probiótico postula que si suficientes bacterias ácido-lácticas pueden ser introducidas en el tracto intestinal durante un período de estrés o desorden (cuando el balance de la flora intestinal favorece al patógeno) o inmadurez inmunológica (neonatos), o bien, después de terapia antibacteriana prolongada (concentración mínima de bacterias ácido lácticas residentes), entonces de la población microbiana indeseable puede ser minimizada o superada. De esta forma, el efecto benéfico de los probióticos puede ser mediado por un efecto antagonista directo contra grupos de microorganismos, resultando en la disminución de su número o algún efecto en su metabolismo, o bien por estimulación de inmunidad.

Son varios los factores que pueden estar involucrados en la inhibición o eliminación de estos microorganismos indeseables por la acción de bacterias ácido-lácticas y levaduras, algunos de ellos son los siguientes:

1. Cambio en la flora bacteriana y reducción de microorganismos patógenos, por la competencia por receptores de superficie a nivel intestinal.
2. La competencia por sustratos con agentes patógenos.

3. Adhesión y/o colonización por los microorganismos seleccionados a nivel de sistema digestivo del animal.
4. La estimulación de la motilidad intestinal.
5. Producción de ácido láctico, con lo que se reduce el pH en el sistema digestivo del animal.
6. Provisión de nutrientes y enzimas digestivas.
7. Optimización en el proceso de absorción de minerales especialmente de zinc, potasio y cobre.
8. Producción de polipéptidos antimicrobianos llamados bacteriocinas, v. gr. Nicina, pediocina A, etc. (Nicina es comúnmente producida en forma semipura a partir de la fermentación de *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) para ser usada como preservativo de alimentos).
9. La estimulación del sistema inmune. El más reciente avance y más explicado modo de acción de los probióticos es la inmunoestimulación. Desde hace años ha sido bien documentado el efecto que la flora normal intestinal tiene sobre el sistema inmune local. El número de linfocitos intraepiteliales, células plasmáticas, y placas de Peyer son mucho menores en animales libres de gérmenes que en animales convencionales. También el número y la actividad fagocítica de linfocitos y macrófagos se ven aumentados tras la administración de especies de *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Sin embargo, más recientemente se han planteado actividad antitumoral en roedores y potenciación de la producción de interferón gamma por linfocitos de sangre periférica estimulas con concaivalina A (Earnshaw, 1990 ; Fuller, 1986; Hekmant, 1992 ; London, 1976; Velmand, 1992).

1.1.3 POTENCIA

La bacteria se reproduce y adapta rápidamente al medio ambiente en el que se encuentra. El número de generaciones de esta bacteria, entre el aislamiento/fermentación, y los métodos de cultivo en la fábrica, pueden reducir la potencia de la bacteria aislada originalmente.

Un tipo de *Lactobacillus* spp. puede demostrar efectividad en la inhibición de coliformes patógenos en el primer aislamiento en pruebas controlada, pero puede "perder" su eficacia después de cierto tiempo.

En la micro flora intestinal, las bacterias aplicadas compiten con otras especies de microbios por los nutrientes y por espacio, así que la producción de componentes inhibidores contra otras especies les confiere una ventaja para la sobrevivencia. Esta producción de las llamadas "bactericinas", tan distintivo como la producción de ácido láctico, puede "variar" debido al proceso industrial de manufactura, puede incluso hasta ser desactivada.

La reproducción industrial de bacterias probióticas es un proceso muy cuidadosamente controlado, inclusive aislado. Las bacterias viven seleccionadas en aislamiento, excluidas de forma que no se encuentren con ningún otro organismo con el que puedan competir, crecen en un medio de cultivo puro y rico en nutrientes, el cual está diseñado para promover la reproducción de células y no la producción de bactericinas. La producción de un inhibidor activo en contra de un competidor ausente, representa un desperdicio de recursos para la célula bacteriana.

El resultado de esto puede ser tal, que los miembros de una población que no producen inhibidores puedan crecer más rápidamente y que cada vez que los cultivos son transferidos a un nuevo medio, la proporción de las células no productoras de inhibidores se incrementa. De esta manera, los nuevos cultivos aislados se adaptan a su nuevo "medio ambiente" sin ninguna otra especie con la cual competir y la población pierde su actividad Inhibidor contra agentes patógenos.

Existen especulaciones de que los cultivos de probióticos pueden perder su capacidad de producir las bactericinas que utiliza para destruir otras bacterias con las que compete, como por ejemplo, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella* y *Clostridium* (Lahtinen, 2006).

1.1.4 VIABILIDAD Y NÚMEROS

Durante el proceso industrial de producción el fabricante tiene que escoger cuando recolectar y secar los cultivos. Idealmente lo óptimo sería tener un número máximo de células en su fase más activa de crecimiento de su círculo vital.

Si se recolectan demasiado pronto, el número total de células será menor que el óptimo y esto representaría una reducción de la eficiencia de la planta, así como un nivel menos óptimo del uso de los recursos.

Si se recolectan demasiado tarde la proporción de células en la biomasa pasaría su óptimo creciendo rápidamente. Estas células son más frágiles que las más jóvenes y fuertes y son más susceptibles a daños posteriores durante las fases de separación, secado, empaque y almacenamiento.

La liofilización puede aniquilar entre el 60 y 90% de las bacterias. Después de eso, en el almacenamiento se podría ver una disminución posterior de la viabilidad de hasta el 99% aunque estas hayan sido almacenadas en condiciones óptimas.

Además, si estas células son incorporadas en “pellets” para alimentación, tendrían que aguantar otro proceso dañino. El proceso de extrusión de alimentos produce altos niveles de calor y estrés por corte, los cuales destruyen un porcentaje de las células y por lo tanto complica aún más el problema de viabilidad.

Las tecnologías de recubrimiento han afirmado que protegen a las células, pero el número de células viables que se venden en estas preparaciones listas para la extrusión, es típicamente del 10% de las bacterias equivalentes que no han sido tratadas.

Las cantidades de células bacterianas contabilizadas dependen de los métodos usados y pueden ser confusos y no ciertos. Recientemente se han hecho algunas investigaciones sobre la viabilidad de las preparaciones de bacterias deshidratadas y la idea de que una célula bacteriana pueda estar viva o muerta ha sido desafiada (Lahtinen, 2006).

El grupo de Lahtinen y su colaboradores, ha continuado el trabajo de Kell y sus colegas y han desarrollado la idea de que las células de bacterias pueden ser caracterizadas en cuatro formas:

1. Viables (activas y cultivables).
2. Inactivas (inactivas pero cultivables en un medio de cultivo optimizado).
3. Activas pero no cultivables.
4. Muertas y no cultivables.

Por lo tanto, la eficacia de los cultivos bacteriales (probióticos) como aditivo para alimento, depende de lo siguiente:

1. La viabilidad inicial y la vitalidad de la cepa empleada como probiótico.
2. El estado de la población microbiana tal como esté presente en el alimento líquido; no solamente las UFC.
3. El tiempo de aplicación de este probiótico al alimento líquido.
4. Las condiciones prevalecientes en el intestino (la fisiología intestinal).

5. Los materiales de la dieta que llegan al intestino.
6. La población microbial presente en el intestino.
7. La colonización de la población aplicada en el intestino.
8. Su capacidad de producir bactericinas (Lahtinen, 2006).

1.1.5 CARACTERÍSTICAS DE UN BUEN PROBIÓTICO

Aunque puede demostrarse experimentalmente un efecto positivo con el uso de probióticos, reemplazando el uso de antibióticos en los alimentos de animales, los resultados obtenidos en diversos campos son variables, de aquí que sea sugerido el siguiente protocolo de evaluación:

1. El probiótico debe tener una cepa la cual sea capaz de ejercer un efecto benéfico en el animal hospedador, v.gr. ganancia de peso, resistencia a enfermedad, siendo la cepa correcta y adecuada al hospedador receptor.
2. Debe ser no patógeno o no toxigénico.
3. Debe estar presente como célula viable, preferentemente en gran número, aunque no se conozca la dosis mínima efectiva.
4. La dieta alimenticia debe ser consistente y adecuada para la actividad de las bacterias probióticas.
5. Debe ser seguro y estable hasta el consumo, sobrevivir en el tracto gastrointestinal y promover balance normal en la microflora.

6. El probiótico no debe adquirir resistencia antibiótica, y no transmitir resistencia antibiótica a otra microflora.
7. La estabilidad de los estudios debe probar que el probiótico sobreviva a la producción típica, embalaje y condiciones de almacenamiento.
8. Costo-eficiente poder añadir suficiente número de UFC por un precio dado.

El uso de la tecnología de microencapsulación puede ayudar a mejorar la estabilidad de los probióticos. Los productores deben de garantizar que una concentración efectiva de probióticos vivos permanezca en el producto al final de su almacenamiento (FAO/ WHO, 2000; Czarnecki-Maulden, 2008).

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras son organismos unicelulares, eucariontes, que se reproducen vegetativamente por gemación, Figura 1 y sexualmente por ascosporas. La célula individual de *S. cerevisiae* es clara, sin color, normalmente de forma esférica u ovoide, pero pueden ser elipsoidales, notoriamente alargadas o también cilíndricas dependiendo de las condiciones en que fueron desarrolladas. Su tamaño se estima de entre 8-10 μm ; pudiendo presentarse solas, en racimos o en masas. Cuando son teñidas con yodo tienen un color amarillo-café, en cambio, al teñirse con cristal violeta y safranina, su coloración va de violeta hasta rojo (García, 2000; Topete, 1986).

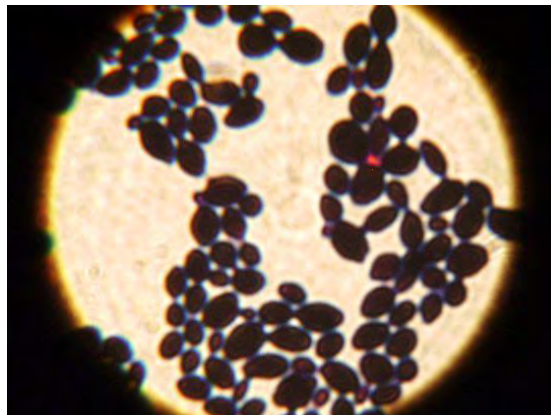


Figura 1. Levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *S. cerevisiae* tienen la siguiente clasificación:

- ✓ División: *Asmastigomycota*
- ✓ Clase: *Ascomycetes*
- ✓ Subclase: *Hemiascomycetidae*
- ✓ Orden: *Endomicetales*
- ✓ Familia: *Saccharomycetaceae*
- ✓ Subfamilia: *Saccharomycoideae*
- ✓ Género: *Saccharomyces* (Michael, 1994).

Dependiendo de las condiciones en que haya sido cultivada *S. cerevisiae*, puede alcanzar de 42 a 69% de proteína cruda altamente digestible. Posee una buena cantidad de aminoácidos (lisina, fenilalanina, treonina, valina, ácido glutámico, leucina, isoleucina, arginina, histidina, tirosina y cistina, a excepción de metionina y triptofano); entre otros compuestos, contiene carbohidratos, grasas y vitaminas del complejo B en las proporciones que muestra la Tabla 2.

VITAMINA	mg/g de <i>S. cerevisiae</i>
Tiamina	136.0
Tiboflavina	28.0
Ácido nicotínico	525.0
Piridoxina	40.0
Ácido pantoténico	695
Ácido Fólico	3.5
Biotina	1.0
Ácido p-aminobenzoico	5.0
Colina	3800.0
Inositol	3900.0

Tabla 2. Proporción de vitaminas que contiene *Saccharomyces cerevisiae* (García, 2000).

La levadura de *S. cerevisiae* cuenta además con nucleína, lecitina, 5-fosfato de guanosina y diastasas principalmente. Finalmente, entre algunos de los elementos que contienen en altas proporciones están el potasio y el fósforo; aunque también contienen en menor concentración manganeso, fierro, cobre, zinc y cobalto. En estudios realizados se demostró que no existe toxicidad ni elementos cancerígenos (Fuller, 1989), por lo que puede añadirse a la dieta en cantidades importantes sin ningún problema; sin embargo la mayoría de los autores estiman aceptable entre 1 y 2 % su inclusión en la ración. (Sarwar, 1985)

La levadura *S. cerevisiae* puede ser cultivado en diversos medios, tales como parafinas pura lineales, aguas residuales de papelera, aguas residuales de cervecería, aguas residuales de destilería, granos de cereal, azúcar de remolacha, melaza, metanol, etanol, alcanos y ácidos orgánicos principalmente. Sin embargo, su desarrollo óptimo es en medios con pH entre 4.0 y 4.8; esto se puede lograr cuando el medio tiene frutas y vegetales. (García, 2000; Olson, 1996).

Como parte de la estructura celular, la pared aporta componentes que son de gran importancia, refiriéndonos a los glucanos, que junto con el manano, conforman a los dos polisacáridos constituyentes de la pared celular (glucano 30 – 40 % y manano 30 %). Además contienen de 6 a 8 % de proteínas (enzimas) y lípidos de 8.5 a 13.5% entre otros.

Los glucanos han sido extensivamente estudiados y son considerados por su actividad inmunofarmacológica, la cual hace que se incremente la resistencia del animal a los virus, bacterias, hongos e infecciones parasitarias; así como su efecto antitumoral que disminuye la carcinogénesis y su amplio rango en su actividad potencial reticuloendotelial (García, 2000; Olson, 1996).

La levadura viva seca *S. cerevisiae* revitalizada en el tracto gastrointestinal, tiene la capacidad de producir antibióticos naturales, ácido acético, ácido láctico y ácido fórmico, en concentraciones que no pueden tolerar los microorganismos causantes de enfermedades; además ataca la cápsula protectora de algunos microorganismos patógenos, aumentando su vulnerabilidad a la acción de defensas naturales. Todo esto hace que el ambiente del tubo digestivo sea menos propicio para los agentes infecciosos especialmente de los que requieren oxígeno; además agotan el suministro de ciertos elementos esenciales para la existencia de bacterias dañinas. Este efecto bacteriostático sobre la población bacteriana patógena permite incrementar la población microbiana normal, así como mantener un pH estable en el tracto gastrointestinal y reducir la tasa de mortalidad por problemas gastrointestinales; mejora la conversión alimentaria, aporta enzimas como amilasas, proteasas y lipasas ausentes en la microflora intestinal del animal joven, incrementando la digestibilidad de la ración, especialmente en lo referente a proteína asimilable, utilización del almidón y el aprovechamiento de la energía de los lípidos.

Por estas razones al adicionarla en la dieta de los animales, la levadura ejerce acciones catalíticas que potencializan los procesos fisiológicos del aparato digestivo, favorece la eliminación e inhibición de algunos factores que hacen más lento el desarrollo, además de que estimulan la mitosis celular; por lo tanto si es suministrada diariamente, el cerdo puede obtener mejores resultados en la eficiencia alimenticia (García, 2000).

Los productos de levadura seca comercialmente disponibles generalmente son subproductos de fermentación de cervecerías, industrias de destilería y de pulpa de papel. En alimentos balanceados se emplea principalmente como un suplemento del complejo vitamínico B. También provee de dos de los factores del crecimiento no identificados que son importantes en las aves de corral.

La levadura que se esté evaluando no debe contener cereales agregados, y debe contener no menos de 1×10^{10} células viables por gramo, su color es amarillo claro cremoso y se produce a veces en forma de perdigones (comprimidos), los cuales tienen el tamaño de una cabeza de alfiler o más pequeños y de forma elipsoidal a claviforme. La mayoría de los productos posee el característico e inconfundible olor de la levadura lo cual aumenta la gustosidad de los alimentos y puede ser agregada a la premezcla o bien en el agua sin perder ninguna de sus propiedades (Sarwar, 1985 ; Thrton, 1996).



Figura 2. Colonias de *Saccharomyces cerevisiae*.

Entre otras ventajas el uso de la cepa *S. cerevisiae*, tiene: una composición constante, un bajo precio, tiene una larga vida por ser desecada, su valor nutritivo es igual o mayor que productos análogos (otros probióticos) debido a que son fuente de vitamina B y glucanos; las condiciones de su producción no están afectadas por la estación del año, los ciclos productivos de otras industrias ni las condiciones climatológicas. Se han utilizado en bovinos, cerdos y aves encontrándose resultados favorables.

1.2.2 *Bacillus*

Los microorganismos *B. subtilis* y *Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis*) son bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas, las cuales forman esporas con forma de elipse, no son patógenas, se aislaron primeramente del aceite y frijol de soya fermentado, su morfología colonial se muestra en la Figura 3, no se desarrollan en pH alcalinos (pH 8) y tiene un porcentaje de esporulación de 85% a 65°C. Durante la fase de iniciación de la esporulación varias especies del género *Bacillus* elaboran enzimas como las proteasas, penicilinazas, nucleasas, fosfatasas, esterasas y carbohidrasas, además de antibióticos polipeptídicos. Su pared celular está compuesta por ácido diaminopimélico, ácido glutámico, alanina, glucosalina, ácido murámico, galactosamina, fósforo y glucosa, el valor de cada uno de estos compuestos es muy similar entre ambas bacterias. Ambas bacterias son susceptibles a los siguientes antibióticos: ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina, ciprofloxacina y enramicina (Hoa et al., 2000; Clements et al., 2002; Alexopoulos et al., 2004; Flores, 1985; Hughes, 1970; Green et al., 1999; Barbosa et al., 2005).

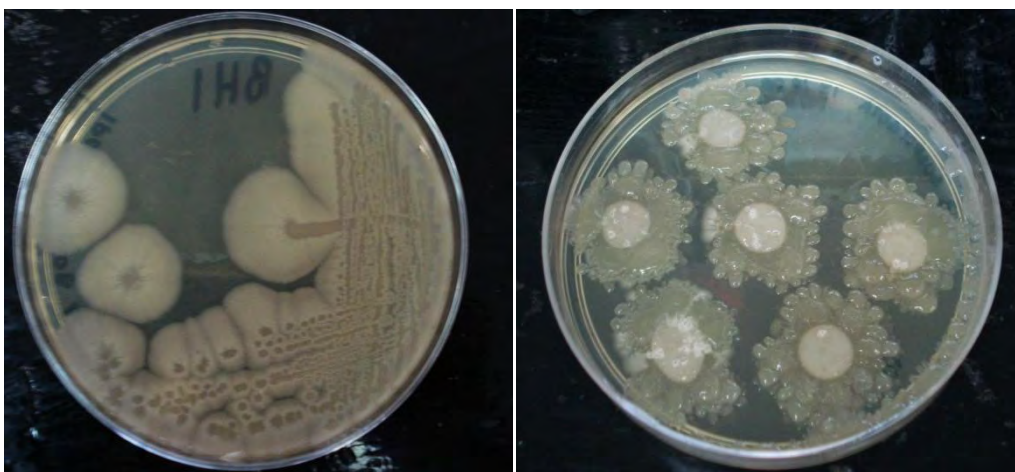


Figura 3. Colonias de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* en medio de cultivo

La bacterias *B. subtilis* y *B. licheniformis* se utilizan en una gran variedad de actividades, como; producción de proteasas y amilasas a nivel industrial, como vehículo para la inmunización, en la producción de antibióticos y como probióticos (Carlisle Falkinham, 1989; Duc et al., 2003; Pinchuk et al., 2001; Alexopoulos et al., 2004).

Entre los antibióticos producidos por diferentes especies de *Bacillus*, algunos son lineales otros son cíclico, como ejemplo podemos mencionar: Bacitracina (*B. licheniformis*), Gramacidina s. (*Bacillus brevis* [*B. brevis*]), Polimixina (*Bacillus polymixa* [*B. polymixa*]), Colistina (*Bacillus colistenus* [*B. colistenus*]), Micobacillina, Bacillina y Bacitracina (*B. subtilis*).

La bacitracina, un antibiótico de tipo polipeptídico, fue descubierta por Balbina A. Johnson en 1943 y a partir de esa fecha ha sido objeto de una serie de estudios. Se ha demostrado mediante estudios de sus propiedades físicas, químicas y biológicas que el antibiótico es un polvo amorfo blanco, altamente higroscópico soluble en agua y en otros solventes (Flores, 1985).

En el caso de *B. subtilis*, también se han realizado experimentos con la finalidad de conocer su desarrollo a través del tracto gastrointestinal. En pruebas in vitro, Duc y sus colaboradores, mostraron que las esporas de *B. subtilis* soportando perfectamente las condiciones estomacales (pepsina 1mg/ml y pH 2.0), con una supervivencia del 100% y una viabilidad de 93%. Al igual las condiciones del intestino delgado (1 mg de tripsina/ml, 0.2% de sales biliares, pH 7.5) durante horas. Tam y colaboradores, también observaron resistencia de las esporas a las condiciones estomacales e intestinales. Sin embargo, encontraron que la forma vegetativa de *B. subtilis* es demasiado sensible al medio estomacal (viabilidad de 0.008%, con un pH 2-3 por 30 minutos y medio intestinal (viabilidad de 0.0001-0.001% por 90 minutos) (Duc et al., 2004; Tam et al., 2006).

Algunos estudios con respecto al tránsito de *B. subtilis* en el tracto gastrointestinal la reportaron presencia de *B. subtilis* en las heces de ratones a las 6 y 24 horas posterior a su consumo, aunque la menor cantidad se observó a las 24 horas posterior a su consumo. Además, usando la técnica de Transcripción Reversa en Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en ingles), encontraron que *B. subtilis* germina en yeyuno e íleon, pero no en duodeno por lo que ellos concluyen que *B. subtilis* puede permanecer en el intestino delgado por un tiempo corto. La explicación mencionada por los investigadores de no encontrar *B. subtilis* en su forma vegetativa en duodeno fue la inhibición que ocasionan las sales biliares sobre la germinación. En otros trabajos han observado en ratones inoculados con *B. subtilis* (una sola inoculación de 5×10^9 esporas), que la cantidad acumulada (7 días de muestreo de esporas excretadas en las heces fueron mayores a la cantidad inoculada, y que aún después de algunos días se observaron esporas en las heces. Sus resultados los llevaron a sugerir que las esporas pudieron germinar, multiplicarse

y esporular de nuevo en el tracto digestivo (Casula y Cutting, 2002; Spinosa et al., 2000; Hoa et al., 2001).

Con los antecedentes anteriores, Tam y colaboradores, realizaron un trabajo donde manipularon tres cepas de *B. subtilis* (una de laboratorio y dos de origen natural) para que se expresaran la toxina tetánica en distintas etapas del desarrollo de *B. subtilis* (en algunos casos en la espora, pero hasta el momento de haber germinado y esporulado de nuevo, y otras en su forma vegetativa). Después de inocular estas cepas en el estómago de ratones, los investigadores encontraron que los valores mayores de IgG anti-toxina tetánica en el suero de los ratones se presentaron para el día 23 y 68 del experimento. Es corresponde al tiempo en que la toxina se expresa en la forma vegetativa y en la espora de *B. subtilis*, respectivamente, con lo que demostraron que *B. subtilis* germina y esporula en el tracto gastrointestinal de ratones. Posteriormente observaron que el único sitio donde germinaron las esporas fue el yeyuno, pero no a una tasa tal que les permita permanecer como microbiota permanente, por lo que concluyeron que *B. subtilis* no coloniza el tracto gastrointestinal. Estos mismos investigadores cultivaron las 3 cepas anteriores en medios enriquecidos con nitratos y nitritos en ausencia de oxígeno, observando que las tres cepas pueden crecer en un medio anaerobio pero solo las cepas de origen natural pueden esporular (eficiencia del 12 a 56%). Lo anterior es un indicativo de que *B. subtilis* puede desarrollar en el medio intestinal anaerobio (Tam et al., 2006; Clements et al., 2002).

La bacteria *B. Subtilis* puede también crecer en cercana asociación con superficies de raíces de plantas. En el laboratorio, cuando *B. Subtilis* fue inoculado en las raíces de *Arabidopsis thaliana*, se observó crecimiento de biofilms, en su morfología colonial ver Figura 4. Además *B. subtilis* puede ser aislada en mayores números que la mayoría de las otras esporas formadoras de bacteria de la rizosfera de una variedad de plantas. Hay evidencia que a través de estas asociaciones *B. subtilis* puede promover crecimiento de plantas. Posibles explicaciones para este crecimiento son: i) *B. subtilis* neutraliza otros microbios que de otra forma afectarían adversamente a la planta; ii) *B. subtilis* activa el sistema de defensas de manera que la planta es puesta en equilibrio para resistir potenciales patógenos; iii) *B. subtilis* hace que ciertos nutrientes sean más alcanzables para la planta (ejemplo: fosforo y nitrógeno) (Bais, 2004; Rudrappa, 2007; Fall, 2004; Cazorla, 2007; Nagorska, 2007).



Figura 4. Morfología del biofilm de *Bacillus subtilis*

Considerando que *B. subtilis* es encontrado en la tierra y alrededor de plantas y que muchos animales consumen plantas, no es sorprendente que esta bacteria es frecuentemente encontrada en heces. El paso de *B. subtilis* a través del tracto gastrointestinal no puede ser sin efecto alguno, la idea de que *B. subtilis* tiene un papel activo dentro del tracto gastrointestinal y ha tenido soporte por años. De hecho, *B. subtilis* ha sido clasificado como un probiótico que cuando es ingerido tiene efectos benéficos probablemente ayudando a mantener o restaurar comunidades bacteriológicas en el cuerpo. *B. subtilis* es también encontrado en varios productos alimenticios fermentados comercialmente disponibles, incluyendo sojas fermentadas con *B. subtilis natto*, el cual es popular en Japón y ha sido ampliamente aceptado como que confiere beneficios a la salud. Pero como su función en el crecimiento de las plantas no está completamente comprendido como *B. subtilis* imparte su efecto probiótico (Nicholson, 2004; Barbosa, 2005; Leser, 2008; Hong, 2004; Inatsu, 2006)

Los trabajos en años recientes han transformado nuestro punto de vista de lo que *B. subtilis* puede hacer dentro del tracto gastrointestinal de animales. Inicialmente, se pensaba que *B. subtilis* era un aerobio que simplemente viajaba a través del tracto gastrointestinal como una espora, la mayoría de la veces de forma anaeróbica.

Sin embargo, cualquier beneficio derivado de su consumo se pensaba era debido a alguna propiedad intrínseca de la espora. Sin embargo recientes evidencias, indican que *B. subtilis* puede completar su ciclo de vida entera dentro del tracto intestinal, yendo de espora a células vegetal y

esporularse de nuevo. De hecho, el crecimiento de *B. subtilis* en el tracto intestinal es suficientemente robusta para que este organismo combata patógenos como *E. coli* en los tractos gastrointestinales de aves de corral administrados oralmente. (Hong, 2004)

1.3 USO DE PROBIÓTICOS EN CERDOS

La aplicación de abundantes bacterias probióticas viables ha resultado en un incremento en el apetito y en un mayor consumo de las cerdas, dando los siguientes resultados:

1. Menor mortalidad en cerdas estresadas antes del parto (*Clostridium difficile*).
2. Mejores y mayores éxitos de parto, resultando en menos lechones nacidos muertos o débiles.
3. Mejor producción de leche durante la primera semana de lactación.
4. Deshechos más uniformes de los lechones al destete.
5. Mayor número de lechones destetados.

La inclusión de *S. cerevisiae* en la dieta de cerdas lactantes puede favorecer el crecimiento de bacterias anaerobias benéficas para el intestino modificando la población bacteriana del tracto digestivo, y por consiguiente el tipo de bacterias que son excretadas al medio ambiente, Sin embargo Mathew y sus colaboradores no encontraron diferencias en la concentración de *E. coli* en el intestino de lechones alimentados con la levadura. Se ha mencionado que la inclusión de las levaduras en la dieta de las cerdas puede incrementar el peso de la camada y estimular el sistema inmune del lechón. Por otro lado, también se ha reportado que la inclusión de *S. cerevisiae* en la dieta de lechones destetados incrementa el consumo de alimento. En el caso de la inclusión de cultivos bacterianos en la dieta de cerdos, las respuestas no han sido consistentes en cuanto a la mejora del crecimiento o de parámetros reproductivos (Cervantes *et. al.*, 2001; Pérez *et. al.*, 2002; Mathew *et al.*, 1998; Pollmann, 1986).

Al utilizar *B. licheniformis* y *B. subtilis* en la alimentación de cerdas a partir del día 109 y hasta el final de la lactación observaron mejoras en el comportamiento productivo de la cerda y su camada. Encontrando un aumento en el consumo de alimento de la cerda en los primeros 14 días de lactancia, disminuyendo el número de diarreas en los lechones, menor mortalidad, y por consiguiente un mayor número de destetados. En otro experimento el mismo grupo de investigadores notaron una disminución significativa en la presentación de diarreas y muertes de cerdos destetados, además de mejoras en la ganancia diaria de peso y en la conversión alimenticia de cerdos de desarrollo y finalización alimentados con dietas que contenían *B. licheniformis* y *B. subtilis* (Alexopoulos *et. al.*, 2004).

Kyriakis y sus colaboradores evaluaron el comportamiento productivo de lechones destetados por un período de 28 días, utilizando cuatro dietas experimentales; una control sin ningún aditivo o promotor del crecimiento, dos adicionadas con diferentes dosis de *B. licheniformis* (10^6 y 10^7 /g esporas viables de alimento) y una cuarta dieta adicionada con *Bacillus toyoi* (*B. toyoi*) (10^6 /g esporas viables de alimento). Estos investigadores encontraron la inclusión de los probióticos disminuyó la presentación y severidad de las diarreas, y por lo tanto la mortalidad. Así mismo, este grupo de investigación observó que los cerdos alimentados con las dietas que contenían los bacilos, presentaron un mayor consumo de alimento y ganancia de peso que el grupo control, adicionalmente los cerdos alimentados con las dietas que contenían los bacilos, presentaron un mayor consumo de alimento y ganancia de peso que el grupo control, además los cerdos alimentados con la dosis alta de *B. licheniformis* (10^7 /g esporas viables de alimento), presentaron un desempeño productivo mayor que el de los otros dos grupos. Otra observación importante en este experimento fue que en los cerdos alimentados con la dieta alta en *B. licheniformis* (10^7 /g esporas viables) y la de *B. toyoi*, no se detectó la presencia de *E. coli* α hemolítica al día 22 del experimento, mientras que en los otros dos grupos si se detecto la presencia de la *E. coli* (Kyriakis *et. al.*, 1999)

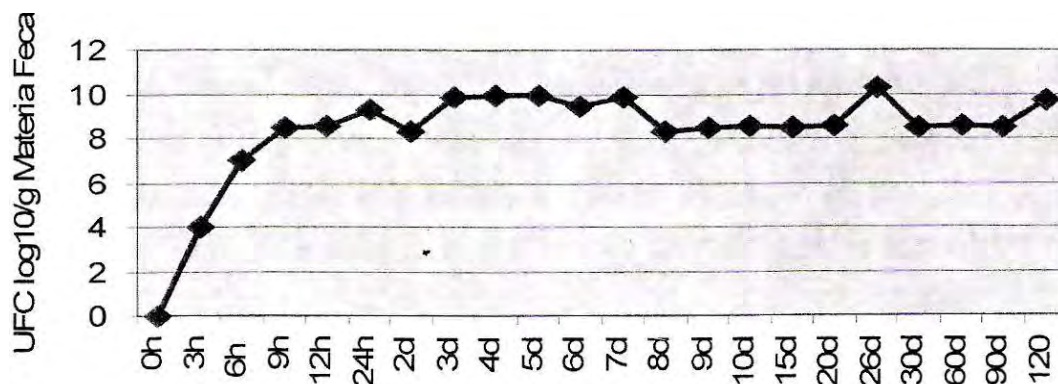
1.4 COLONIZACIÓN BACTERIANA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

El comportamiento de sucesión bacteriana del tracto digestivo del lechón durante los primeros meses de vida ha sido estudiado por varios investigadores, entre estos Swords que observó la evolución de la microbiota fecal (de cerdos) durante los primeros 4 meses de vida, periodo que fue dividido en tres fases. La primera fase, corresponde a la primera semana de vida, la segunda fase comprende desde el final de la primera semana de vida hasta el destete, y tercera fase concierne desde el destete hasta la adaptación al alimento seco. Sin embargo, el establecimiento de la microbiota intestinal, en un neonato es compleja, ya que comprende: la contribución bacteriana proveniente de la madre y la del medio ambiente que lo rodea, de la interacción de la microbiota con el hospedador, de factores dietarios, no dietarios y de las diferencias propias de cada individuo (Swords et al., 1993; Mackie et al., 1999; Simpson et al., 2000; Inoue et al., 2005).

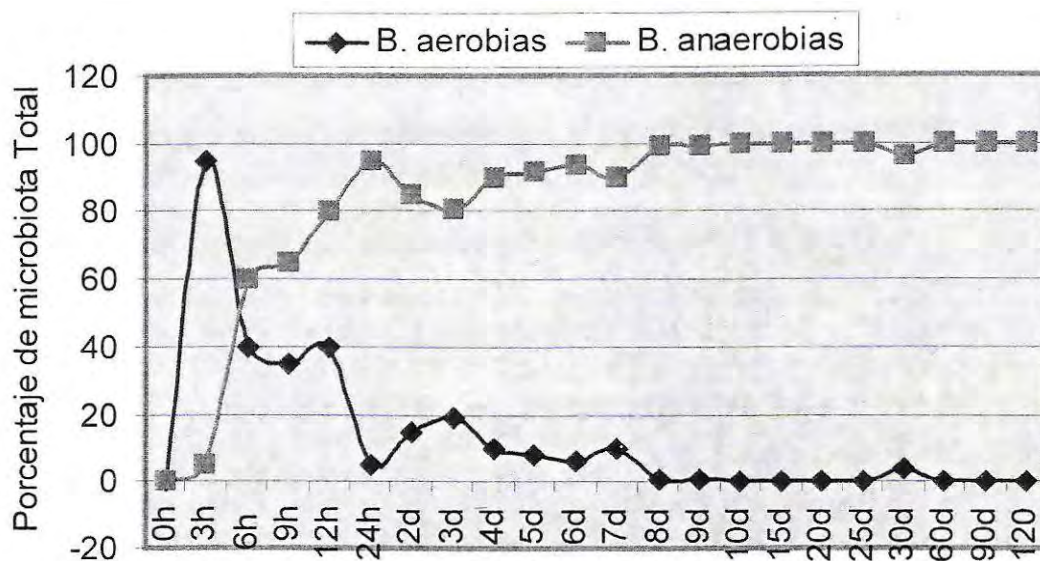
Antes del nacimiento, el tracto gastrointestinal de los lechones es estéril, al momento del nacimiento estos tienen contacto con una amplia variedad de bacterias provenientes del canal de parto y del contacto con las heces maternas, posteriormente durante el primer amamantamiento, el recién nacido traga las bacterias que se encuentran en los pezones y epitelio del conducto del pezón (Conway, 1997; Mackie et al., 1999).

La primera fase de colonización bacteriana en el intestino de los lechones es extremadamente rápida, a las 12 horas de vida del lechón, el colon tiene una población bacteriana de 10^9 Unidades formadoras de colonias por gramo de heces (UFC/g) Gráfica 1. De las bacterias encontrados en ésta etapa, predominan las bacterias aerobias y anaerobias facultativas (80% de la flora), la presencia de estas bacterias se debe a la disponibilidad de oxígeno en el tracto gastrointestinal. Conforme se utiliza el oxígeno, el ambiente del tracto cambia, favoreciendo crecimiento y colonización de las bacterias anaerobias estrictas, las cuales a solo 48 horas después del nacimiento representan el 90% de la microbiota total, Grafica 2. Usando impresión dactilar y la capacidad fermentativa de las bacterias intestinales en la cerda y sus lechones, han encontrado una alta similitud entre la flora intestinal de la madre y de sus crías durante la primer semana de vida de los lechones. Lo que confirma que microbiota intestinal de la cerda es la primera fuente de bacterias para la colonización intestinal de los lechones. Sansom y Glead, usaron isotopos

radioactivos en el alimento de cerdas en lactación (alojadas en corrales de piso sólido), encontraron que los lechones consumen un promedio de 20.9 ± 2 gramos de heces de cerda por día es por esto que la microbiota intestinal de la madre tiene influencia directa sobre la microbiota intestinal del lechón en esa fase (Katouli et al., 1997; Sansom y Gleed, 1981).



Gráfica 1. Cantidad de bacterias totales (Unidades formadoras de colonias log/gramo de materia fecal) desde el nacimiento a 120 días (Adaptado de Swords et. al., 1993).



Gráfica 2. Evolución de bacterias aerobias y anaerobias en heces de lechones del nacimiento al día 120 de edad (Adaptado de Swords et. al., 1993).

Para la fase dos, se observó un incremento de la diversidad bacteriana donde se manifiesta el dominio de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococos*, con una concentración de 10^7 a 10^9 UFC/g

de digesta En esta misma fase se disminuye la proporción de las bacterias coliformes totales, *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.* y *Enterococcus* con respecto a la fase uno de sucesión bacteriana. Además, durante esta fase (posterior a una semana de lactancia) se ha reportado que los patrones bacterianos de los lechones y la cerda ya no fueron tan similares (Swords et al., 1993; Inoue et al., 2005; Katouli et al., 1997).

1.5 EL CERDO COMO ESPECIE PRODUCTIVA

Entre los animales domésticos existen grandes diferencias de producción y rendimiento, en este caso el cerdo rinde hasta el 75% de carne en canal y este rendimiento es mayor que en los bovinos; además de proveer nutrimento en forma tan eficiente como otros animales. El cerdo tiene un gran poder de conversión alimentaría, mejor asimilación de los alimentos, mayor capacidad para aprovechar la proteína cruda e ingerir considerables cantidades de líquidos.

Por el carácter omnívoro de su alimentación y diversas necesidades nutritivas, puede ser alimentado con variados productos y subproductos animales y vegetales. El factor más importante que ha determinado la escasa población de cerdos, es el grave problema de pérdidas por la insuficiencia en peso de los lechones al nacer (García, 2000).

Dos de las etapas críticas para la producción porcina son la lactancia y el destete, problemas productivos e infecciosos durante estas dos etapas se pueden determinar la rentabilidad y las explotaciones porcinas. Por otro lado sabemos que la colonización bacteriana del sistema digestivo comienza en el canal de parto al momento de nacer influyendo fuertemente también los microorganismos ambientales. En las explotaciones tecnificadas la colonización del tracto digestivo del lechón está ampliamente relacionada a la población bacteriana del tracto digestivo de la madre, quien a través de sus excreciones influencia el tipo de microorganismos que colonizará el tracto digestivo del lechón (Tannock et al., Zetterstrom et al., 1994; Jadamus et al., 2000).

La capacidad productiva del lechón depende del destete, potencial genético, condiciones del medio ambiente y factores nutricionales (García, 2000).

1.6 IMPORTANCIA DEL DESTETE

Durante el destete los lechones pueden sufrir alteraciones debidas a diversos factores, tales como: medio ambiente (diferente temperatura de la incubadora y los corrales), factor social (separación entre el cerdo y su camada, jerarquización y espacio disponible entre ellos) y factor nutricional (cambio de dieta líquida “leche” a dieta sólida).

El más importante de estos factores es el nutricional, ya que es el más difícil de controlar; por ejemplo, en el destete se cambia la fuente de nutrimentos, en lugar de lactosa, le ofrecemos almidón y otros polisacáridos como fuentes de carbohidratos. Si el lechón no puede digerir adecuadamente el alimento, éste da lugar a fermentaciones que se traducen en diarrea, lo que agrava el hecho de que el lechón no pueda aprovechar los alimentos. Esto a su vez, hace que se detenga la ganancia de peso o incluso se presente una disminución. La variedad de ingredientes que incluye la dieta, determinará el control de una buena productividad en los lechones (Fuller, 1989; Soriano, 1980).

1.8 JUSTIFICACION

Reciente interés referente a resistencia antibiótica y el uso de agentes probióticos en ganado ha resultado una demanda para estrategias alternativas para mejorar la producción y salud animal sin la necesidad de antibióticos, para evitar o prevenir alteraciones en el tracto gastrointestinal en cerdas lactantes y lechones, estimulando la flora intestinal existente, y favoreciendo la actividad inhibitoria de enterobacterias durante la lactancia y al destete. Por lo anterior se pretende probar si la combinación de *S. cerevisiae* con las bacterias *B. subtilis* y *B. licheniformis* puede impactar en la salud intestinal de la cerda y del lechón, lo que pudiera representar mejoras en el comportamiento productivo de ambos. Muchos factores pueden influir en la eficacia de estas preparaciones como podrían ser: genéticas, fisiológicas o el estado de salud del animal, así como la dieta, las condiciones del medio ambiente, etc. Aunque producen efectos benéficos en el crecimiento y en la salud del animal, no siempre puede ser demostrado, esto se presenta a menudo en cerdos recién nacidos, antes y después del destete. Por ejemplo, la administración de probióticos elimina o disminuye los cuadros de diarrea crónicos que se presenta a estas edades. Los lechones son animales muy susceptibles a desarrollar diarreas siendo la *E. coli* la bacteria más frecuentemente involucrada. Actualmente existe, una tendencia a disminuir el uso de antibióticos por los efectos colaterales que traen, por eso se están desarrollando nuevos productos, que apoyen el control de diarreas, tales como los probióticos los cuales deben ser debidamente elaborados para que realmente se logre el objetivo, de aquí la necesidad de evaluar previamente a los microorganismos que puedan ser incluidos en el alimento.

Por lo tanto la hipótesis planteada para el presente trabajo es:

Si, se modifica la dieta de cerdas lactantes con la adición de *S. cerevisiae* y *B. licheniformis*-*B. subtilis*, entonces se observara una actividad inhibitoria en el crecimiento de enterobacterias aisladas en las cerdas y en los lechones.

2.0 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus licheniformis* - *B. subtilis*, así como de su combinación en la dieta de cerdas lactantes y lechones al destete.

2.1 OBJETIVOS PARTICULARES:

- ✓ Evaluar la actividad inhibitoria de los probioticos en el crecimiento de enterobacterias, durante el periodo de lactacia y de destete en las cerdas y en los lechones.
- ✓ Confirmar la presencia de los probióticos *S. cerevisiae* y *B. Licheniformis* - *B. subtilis* a través del aislamiento de estas cepas a partir de muestras de heces fecales.
- ✓ Cuantificar los coliformes totales a través de la técnica del número más probable (NMP) en muestras de heces fecales.
- ✓ Aislar e identificar microorganismos en condiciones aerobias y anaerobias, sembrando en placa de Agar Sangre y Agar Soya Trypticaseína.

3.0 MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en conjunto con el MVZ Alejandro Castellanos Aceves, para su Tesis de Maestría, pero en el presente trabajo solo se abordó el diseño experimental correspondiente a la administración de los probióticos en la dieta de cerdas y lechones y a la obtención de muestras de heces fecales para los cultivos bacteriológicos el cual se describe de la Figura 5 a la 13. Este trabajo se desarrolla en dos fases, la primera consiste en administrar los probióticos a la cerda durante la lactancia, muestreándola a ella y a un lechón de su camada. La segunda fase corresponde a la administración del probiótico después del destete.

3.1 FASE 1

3.1.1 Sitio Experimental. El estudio se realizó en las instalaciones porcinas del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología Animal del INIFAP, Ubicado en el Km 1 de la Carretera a Colón, en Ajuchitlán, municipio de Colón, Querétaro.

3.1.2 Dietas experimentales. En esta fase del experimento se utilizaron las dietas como se muestran en la Tabla 4 (ver anexo) que fueron administradas a las cerdas durante la lactancia. Las dietas se identifican de la siguiente manera: una dieta Control (T1), en base a sorgo y soya, formulada para satisfacer las necesidades de la cerda lactante (NRC, 1998); para la segunda dieta se utilizó la dieta control adicionada con *S. cerevisiae* (T2); en la tercera dieta se utilizó también la dieta control más la adición de *B. licheniformis* y *B. subtilis* (T3); y para la cuarta dieta se utilizó la misma dieta control adicionada tanto con *S. cerevisiae*, como de *B. licheniformis* y *B. subtilis* (T4).

3.1.3 Animales. Para la realización de este proyecto se utilizaron 40 cerdas lactantes y sus camadas, por tratamiento, es decir un total de 160 cerdas. Por lo que se requirió de 13 a 20 grupos de parición para completar el experimento. La unidad experimental es la cerda y su camada.

Durante la gestación las cerdas recibieron el mismo manejo y dieta de gestación, el consumo de alimento fue de 2.5kg/día, dividido este en dos comidas (1.25 kg por comida). Para el día 110 de gestación las cerdas se asignaron de manera aleatoria a una de las cuatro dietas experimentales antes descritas (T1, T2, T3 Y T4), se ofrecieron 2 kg de alimento a la cerda hasta el día de parto. El día 109 de gestación las cerdas fueron trasladadas a la sala de maternidad.

3.1.4 Cultivos bacterianos de contenido fecal:

Llegadas las cerdas a la sala de maternidad se les tomaron una muestra de heces directamente del recto (2 gramos). Cada muestra fue colocada dentro de una bolsa de plástico, rotulada con el número de identificación de la cerda, tratamiento y fecha de muestreo, a esta toma de muestra se le asignó como día 0. De igual manera se tomó una muestra de heces de los lechones al nacimiento, esta fue tomada al azar dentro de cada camada, posteriormente para el día 14 de lactación se tomó una muestra a cada camada al azar. Al día del destete se muestrearán las cerdas y un lechón de cada camada registrándolas como día 28, el procedimiento descrito anteriormente se observa en la Figura 5.

Las muestras se refrigeraron a 4 °C para transportarlas al laboratorio de virología de la unidad de posgrado, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, Cuautitlán Izcalli, México. Las muestras fueron tratadas de acuerdo al esquema general de la Figura 7 para realizar los cultivos bacteriológicos.

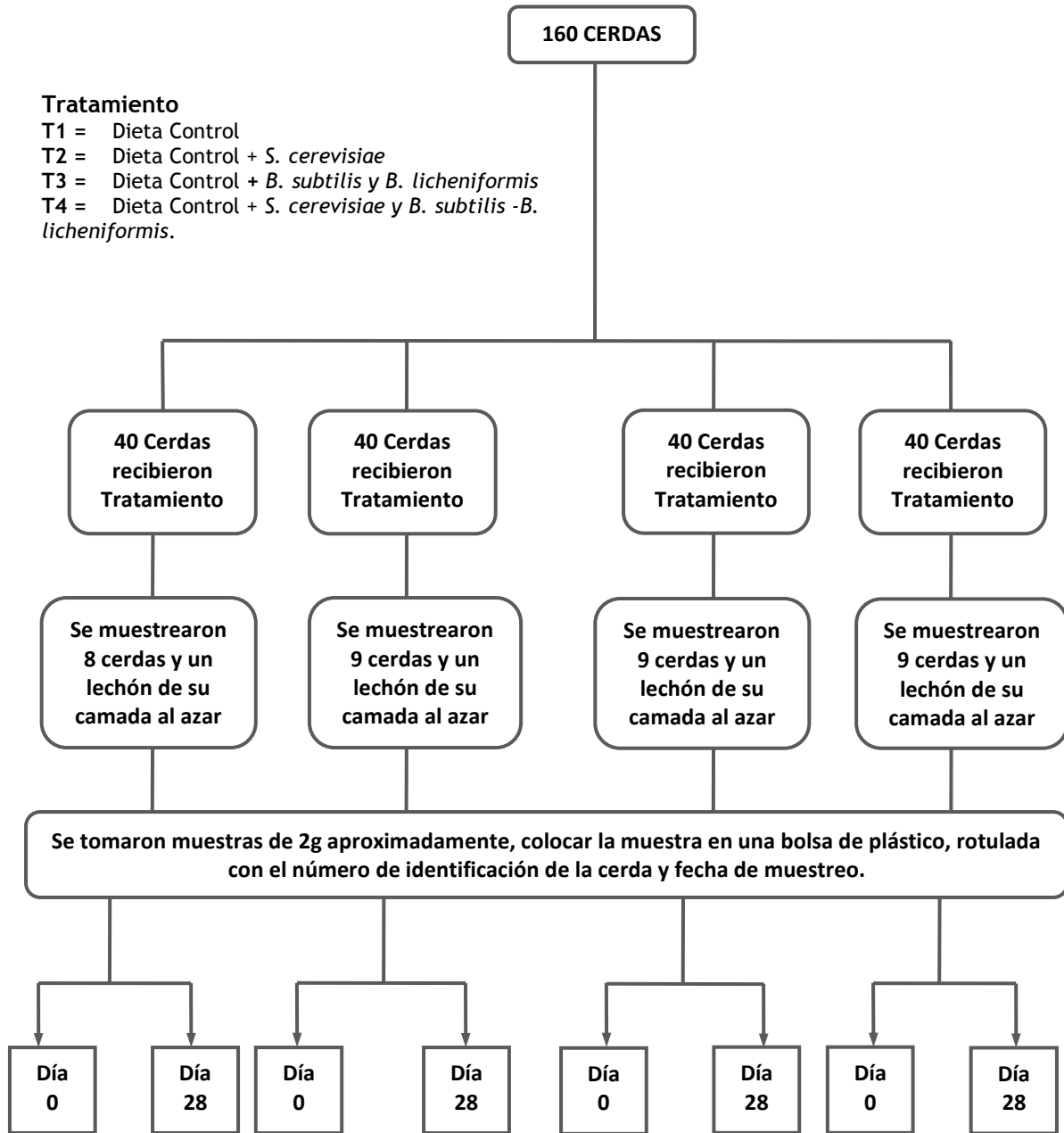


Fig. 5 Obtención de muestras fecales para cultivos bacterianos en etapa 1

3.2 FASE 2

3.2.1 Dietas Experimentales. Para esta parte del experimento se utilizaron las dietas de las Tablas 5, 6 y 7 (ver anexo) postdestete basadas en sorgo y soya, formuladas para satisfacer las necesidades nutricionales de los cerdos destetados (NRC, 1998) que se diferencian solo en la presencia o no del probiótico. Las dietas experimentales incluyen una dieta control (T1), la cual no incluye ningún Probiótico, una segunda dieta donde se incluye *S. cerevisiae* (T2), la tercera dieta incluye *B. Licheniformis* y *B. subtilis* (T3) y una cuarta dieta que contiene la combinación de *S. cerevisiae* y *B. licheniformis* - *B. subtilis* (T4). Las dietas fueron asignadas dando seguimiento a las dietas que recibieron las madres durante la lactación, los lechones dentro de sus tratamientos fueron distribuidos aleatoriamente.

3.2.2 Animales. Se utilizaron 384 lechones, el número de grupos de destete a utilizar dependerá del número de lechones en cada grupo, pero se estima que se utilicen entre 4 y 6 grupos de destete.

En la sala de destete los lechones se mantuvieron bajo las mismas condiciones de manejo y clima, teniendo agua y alimento a libre acceso. Los lechones se alojaron en corrales con capacidad para 4-6, esta variación dependerá de la disponibilidad de lechones. La unidad experimental fue el corral.

3.2.3 Cultivos bacterianos de contenido fecal:

Se tomaron muestras de heces a un lechón por jaula, los días 0, 14, y 28 de estancia en la sala de destete. El lechón al que se le tomó la muestra fue seleccionado al azar dentro de cada corral. La muestra de heces fue tomada directamente del recto con hisopo estéril y transportada en refrigeración a 4°C al laboratorio de análisis. Se tomaron, como se muestra en la figura 6. Las muestras fueron sometidas a cultivos bacteriológicos para determinar la presencia de *E. coli*, *Salmonella cholerae sui* (*S. cholerae sui*), *Salmonella* (*S. typhimurium*), *S. cerevisiae*, *B. subtilis* *B. licheniformis*. Se manejaron las muestras siguiendo el esquema de la figura 7.

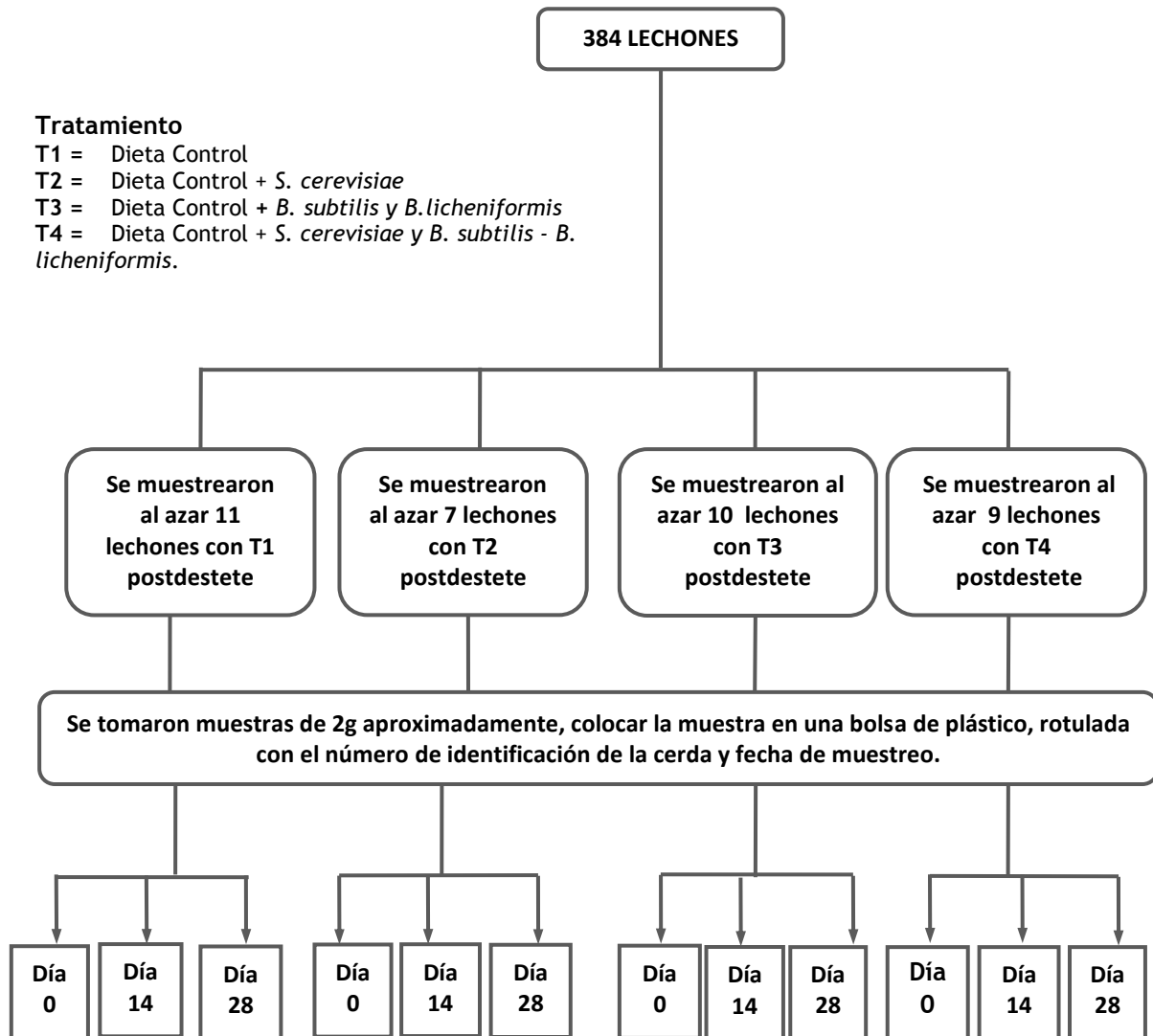


Fig. 6 Obtención de muestras fecales para cultivos bacterianos de la etapa 2

3.3 DIAGRAMAS DE FLUJO GENERAL

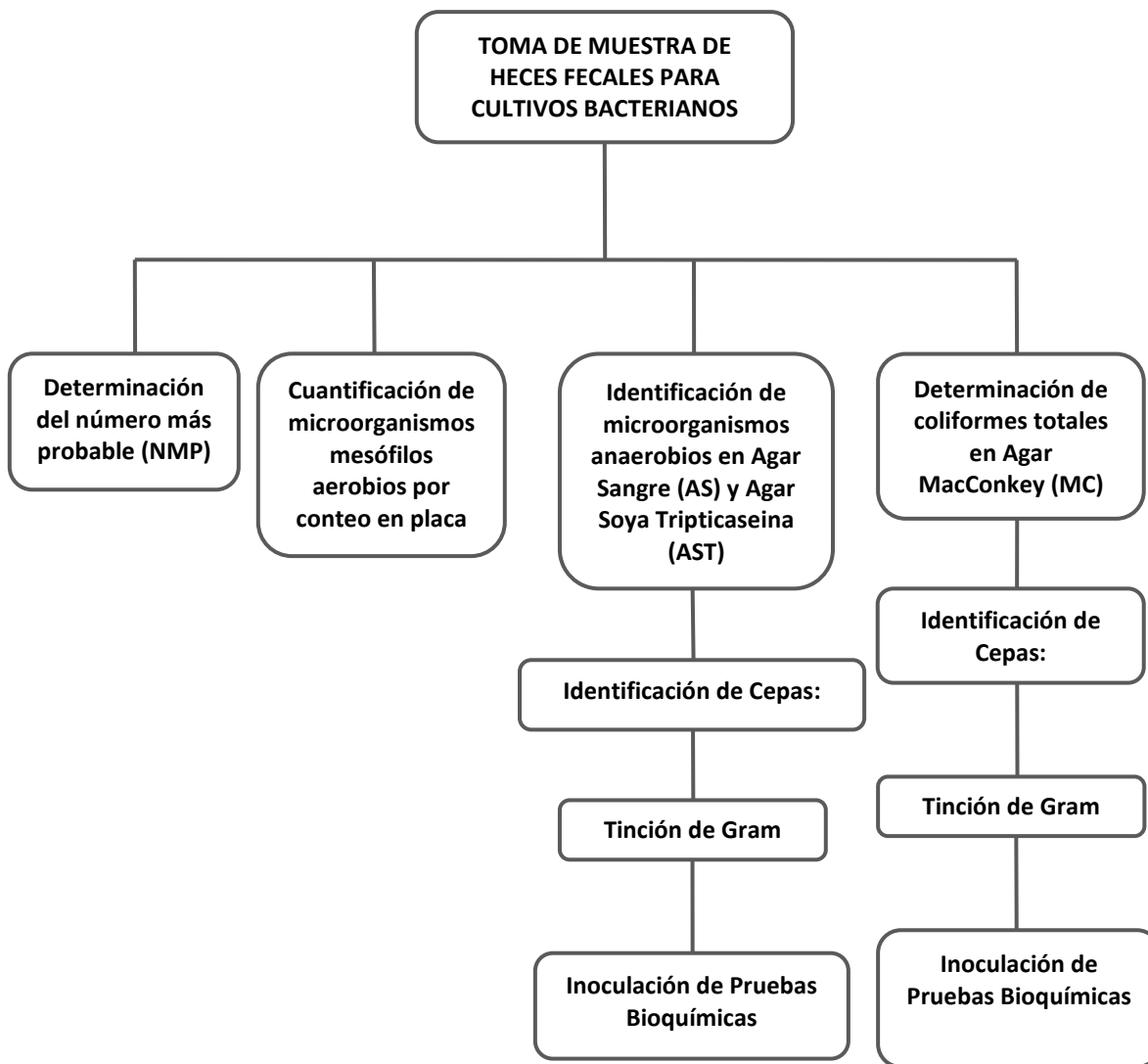


Fig. 7 Diagrama de flujo a seguir para las muestras de heces fecales llegadas al laboratorio

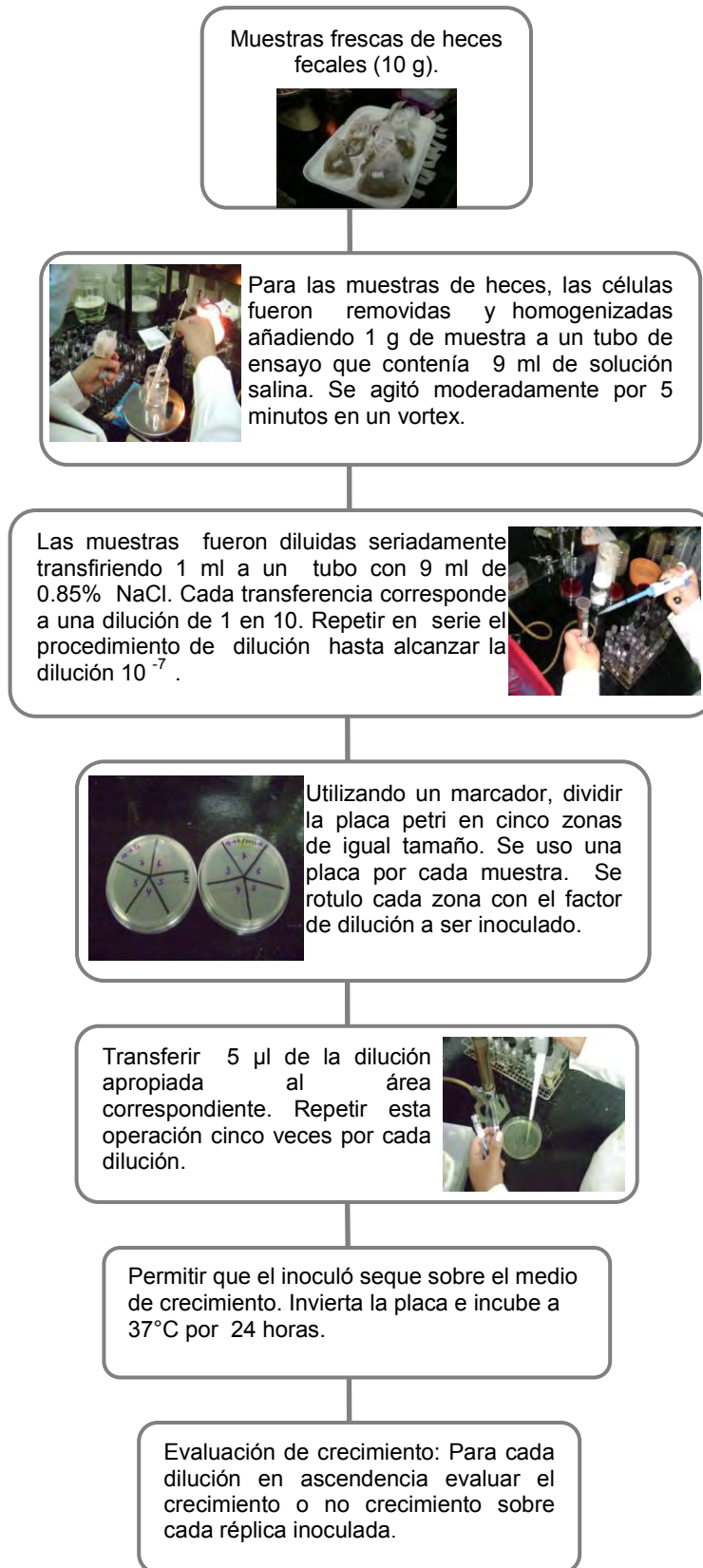


Fig. 8 Diagrama de Flujo para Técnica del Número Más Probable

Utilizando los valores ofrecidos en la Tabla 3, se determinó la población estimada para su muestra (ej., 5-5-3-2-0: 1,383). Si su patrón de respuestas no está en la tabla, promedie el valor estimado del patrón superior e inferior presente en la Tabla 3 (ej., 5-4-1-1-0 no está en la Tabla 3, entonces promedie 5-4-1-0-0 (169) y 5-4-2-0-0 (216) como el resultado más apropiado: $5-4-1-1-0 = (169+216)/2 = 193$). Este valor obtenido es el NMP sin ajustar. Para calcular la densidad poblacional de la muestra, entonces tendrá que multiplicar el NMP sin ajustar, por el factor de corrección de volumen, por el recíproco del factor de dilución menor inoculado en la placa (ej., 5-5-3-2-0: $1,383 \times 200 \times 1000 = 2.78 \times 10^8$ células/g de heces).

La densidad poblacional estimada se está asumiendo en 1 ml del inóculo. Este valor debe ser ajustado por el factor de dilución y el volumen de inóculo (por ejemplo, si usted inoculó en cada placa un volumen de 5 μ l, entonces el valor de la tabla deber corregido multiplicándolo por 100 [$5 \times 200 = 1000 \mu$ l o 1 ml]).

Tabla 3. El número más probable para series de diluciones en réplicas de cinco por nivel de dilución (Woomer, 1994)*.

Núm. Respuestas Pos. por Nivel de Dilución	Población estimada	Núm. Respuestas Pos. por Nivel de Dilución	Población estimada
1-2-3-4-5-6		1-2-3-4-5-6	
1-0-0-0-0-0	1.9	5-5-4-2-0-0	2159
1-1-0-0-0-0	4.0	5-5-4-3-0-0	2716
2-0-0-0-0-0	4.4	5-5-5-0-0-0	2305
2-1-0-0-0-0	6.8	5-5-5-0-1-0	3126
3-0-0-0-0-0	7.7	5-5-5-1-0-0	3282
3-1-0-0-0-0	10	5-5-5-1-1-0	4532
3-2-0-0-0-0	13	5-5-5-2-0-0	4922
4-0-0-0-0-0	12	5-5-5-2-1-0	6918
4-1-0-0-0-0	16	5-5-5-3-0-0	7797
4-2-0-0-0-0	21	5-5-5-3-1-0	10702
4-3-0-0-0-0	27	5-5-5-3-2-0	13826
5-0-0-0-0-0	23	5-5-5-4-0-0	12753
5-0-1-0-0-0	31	5-5-5-4-1-0	16902
5-1-0-0-0-0	33	5-5-5-4-2-0	21589
5-1-1-0-0-0	45	5-5-5-4-3-0	27150
5-2-0-0-0-0	49	5-5-5-5-0-0	23054
5-2-1-0-0-0	69	5-5-5-5-0-1	31225
5-3-0-0-0-0	78	5-5-5-5-1-0	32720
5-3-1-0-0-0	107	5-5-5-5-1-1	45261
5-3-2-0-0-0	138	5-5-5-5-2-0	49224
5-4-0-0-0-0	127	5-5-5-5-2-1	69148
5-4-1-0-0-0	169	5-5-5-5-3-0	78127
5-4-2-0-0-0	216	5-5-5-5-3-1	107022
5-4-3-0-0-0	270	5-5-5-5-3-2	138269
5-5-0-0-0-0	230	5-5-5-5-4-0	127528
5-5-0-1-0-0	312	5-5-5-5-4-1	169028
5-5-1-0-0-0	327	5-5-5-5-4-2	215899
5-5-1-1-0-0	453	5-5-5-5-4-3	271557
5-5-2-0-0-0	488	5-5-5-5-4-4	334051
5-5-2-1-0-0	692	5-5-5-5-5-0	230546
5-5-3-0-0-0	780	5-5-5-5-5-1	328192
5-5-3-1-0-0	1070	5-5-5-5-5-2	492238
5-5-3-2-0-0	1383	5-5-5-5-5-3	781272
5-5-4-0-0-0	1275	5-5-5-5-5-4	1312535
5-5-4-1-0-0	1690		

Se marcaron 2 cajas Petri estériles para cada una de las siguientes diluciones: 0, 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}



A partir de las diluciones realizadas a las muestras de heces para la técnica anterior, pipetear en cajas de Petri duplicadas y alícuotas de 1 ml de las diluciones: 0, 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}

Este procedimiento se realizó por duplicado, teniendo así 2 cajas para cada dilución.

Se agregó a cada placa agar para métodos estándar y se homogenizó la mezcla con 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante para incorporar el inóculo en el medio.



Se dejó solidificar el medio, después se invirtieron las cajas y se incubaron durante 24 horas a 25 y 35 °C.

Después del periodo de incubación, contar las colonias contenidas en cada una de las cajas y seleccionaron aquellas que se encuentren en el intervalo de 25 a 250 colonias.



Fig. 9 Cuantificación de microorganismos mesófilos aerobios por conteo en medio a 25 y 37 °C



Fig. 10 Identificación de microorganismos anaerobios en agar sangre y agar soya tripticaseína

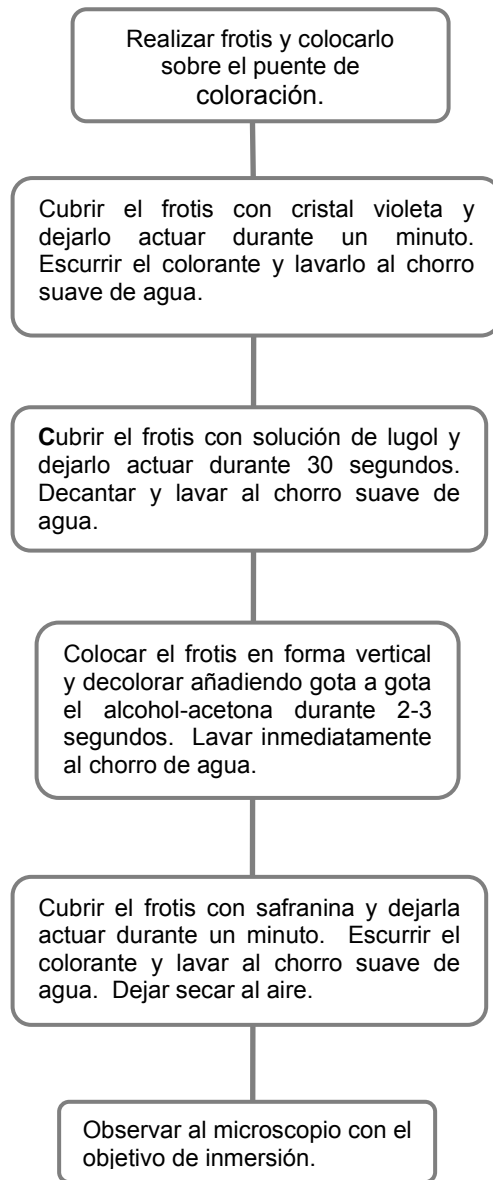


Fig. 11 Diagrama de flujo de tinción de Gram

Para aislar y cuantificar *E. coli* en heces se realizó sembrado en placa con el medio de cultivo Mc Conkey, se incubaron a 37 °C por 24 horas, las colonias identificadas con las características típicas de *E. coli*, *Salmonella sp* serán tipificadas a través de análisis bioquímico.

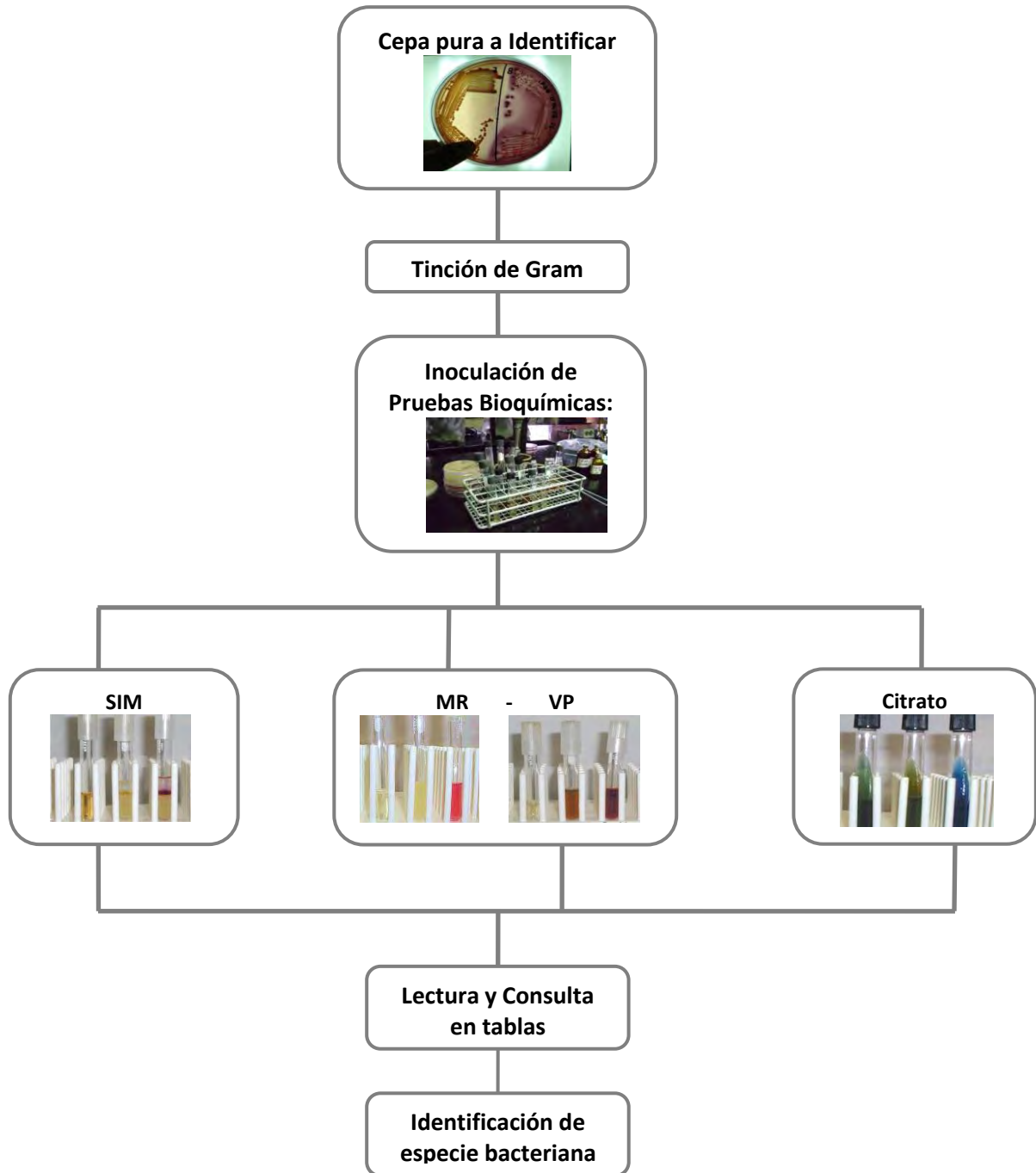


Fig. 12 Identificación de especies de enterobacterias

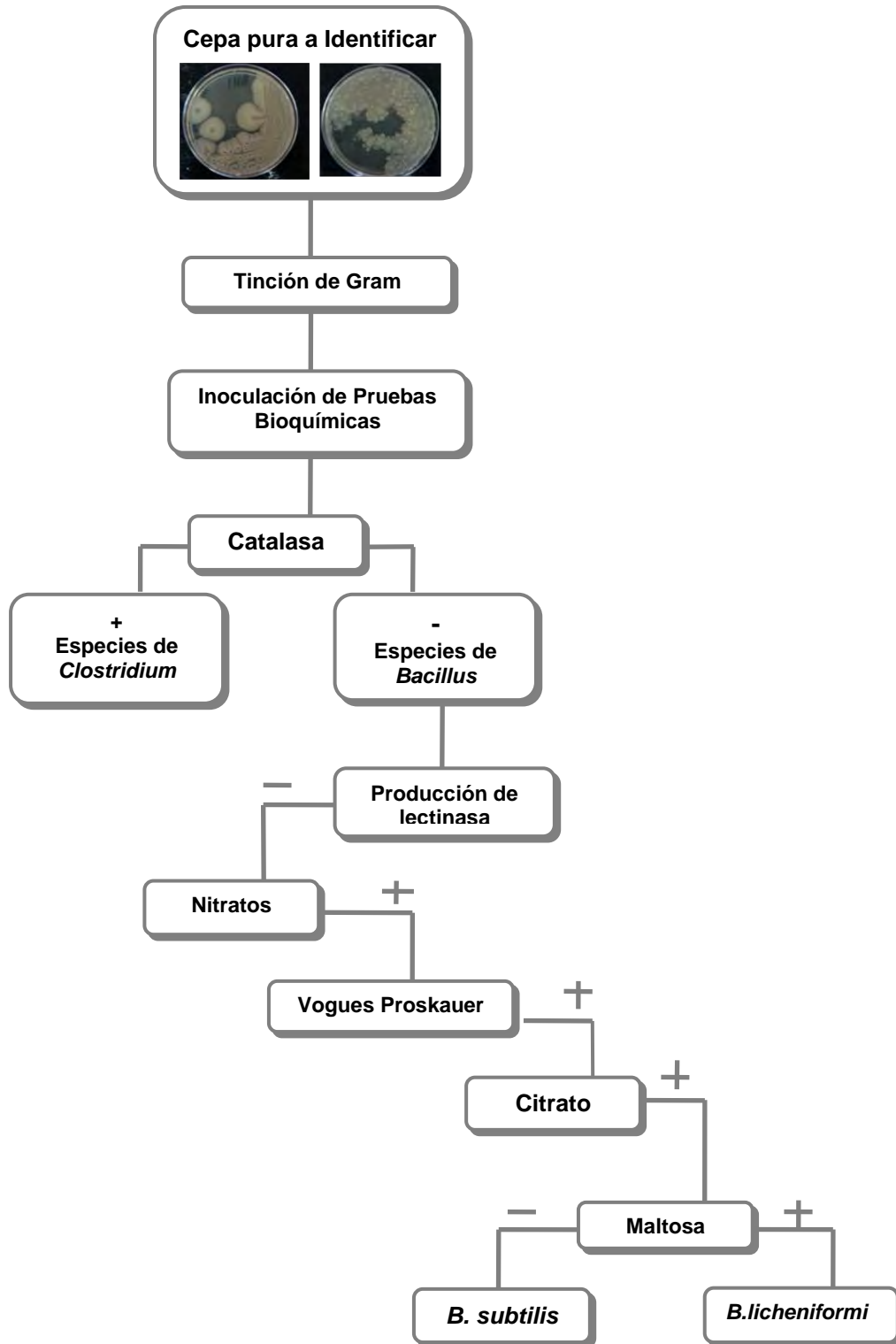


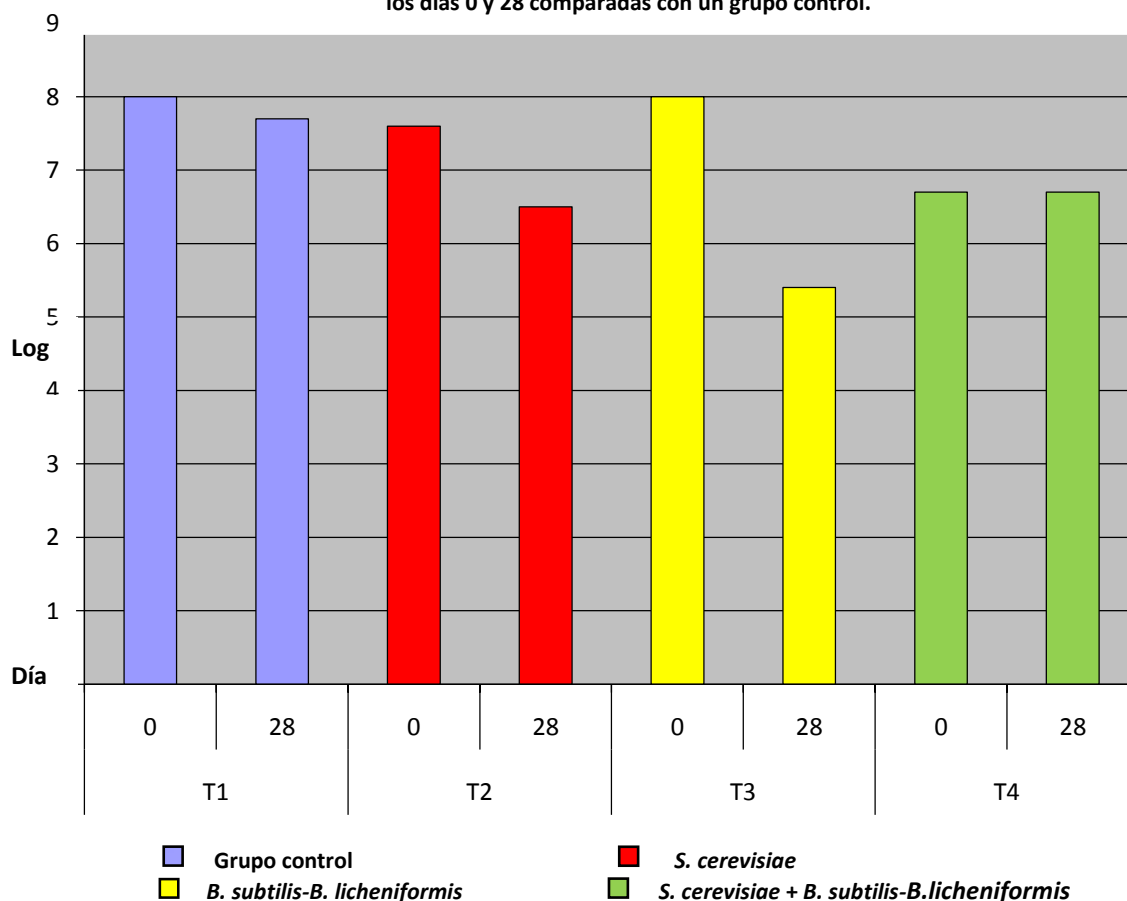
Fig. 13 Diagrama de flujo para la identificación de especies del genero *Bacillus*

4.0 RESULTADOS

Los resultados del presente trabajo se obtuvieron a través de las técnicas mencionadas anteriormente, pero los más representativos son los de el número más probable, (UFC log/g de heces), que fueron tratados estadísticamente, obteniéndose el promedio de cada uno de los tratamientos en cada una de las fases del experimento, determinando así, si existe un efecto de inhibición de enterobacterias por los probióticos *S. cerevisiae* y *B. licheniformis*- *B. subtilis*.

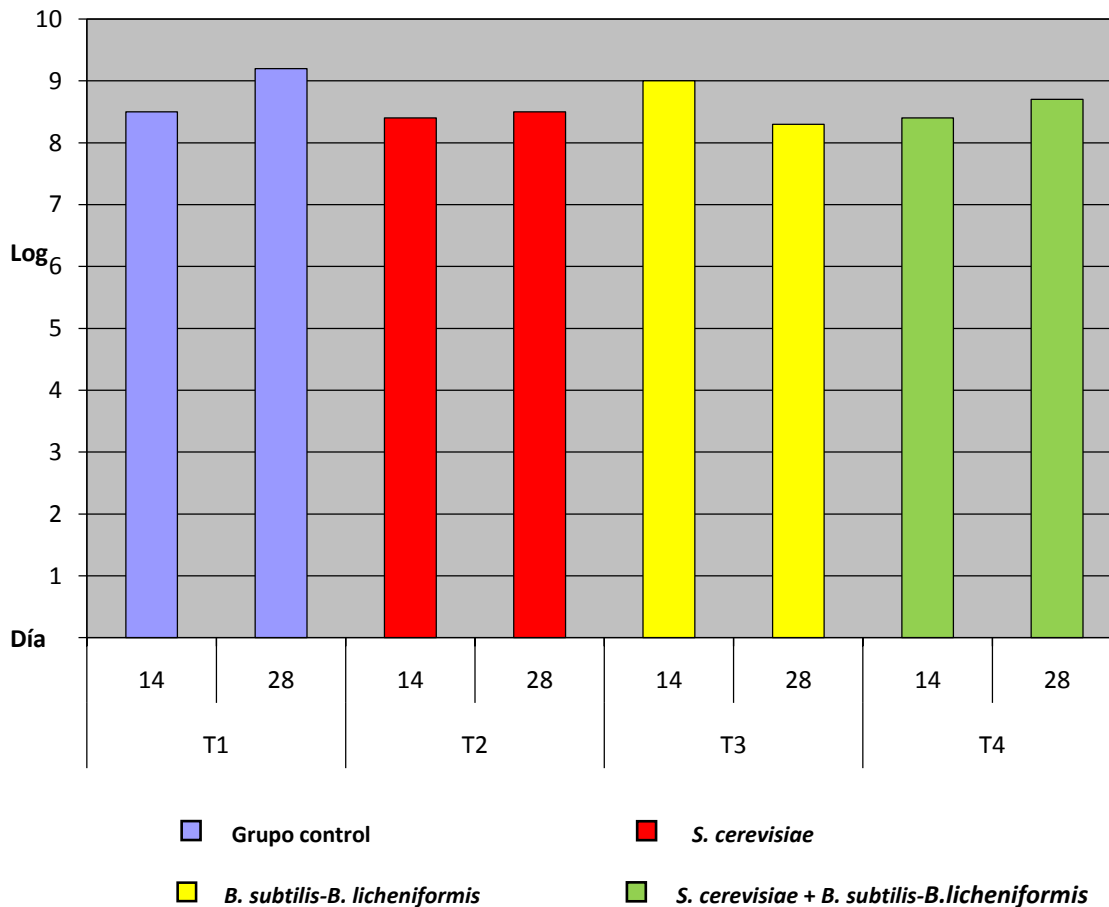
La Gráfica 3 muestra los resultados de los efectos de los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis* y *S. cerevisiae*, y la combinación de estos en cerdos hembra durante la lactancia, en el cual se observa un decremento en el número de UFC log/g de heces fecales del día 0 al día 28 en los cerdos tratados con los probióticos con respecto al grupo control. Sin embargo no se observa un efecto constante, para todos los tratamientos, de esta fase del experimento.

Gráfica 3. Promedio de bacterias totales (UFC log/g de heces determinadas en cerdos hembra tratados con los probióticos *S. cerevisiae*, *B. subtilis*-*B. licheniformis* o la combinación de ambos durante la lactancia en los días 0 y 28 comparadas con un grupo control.



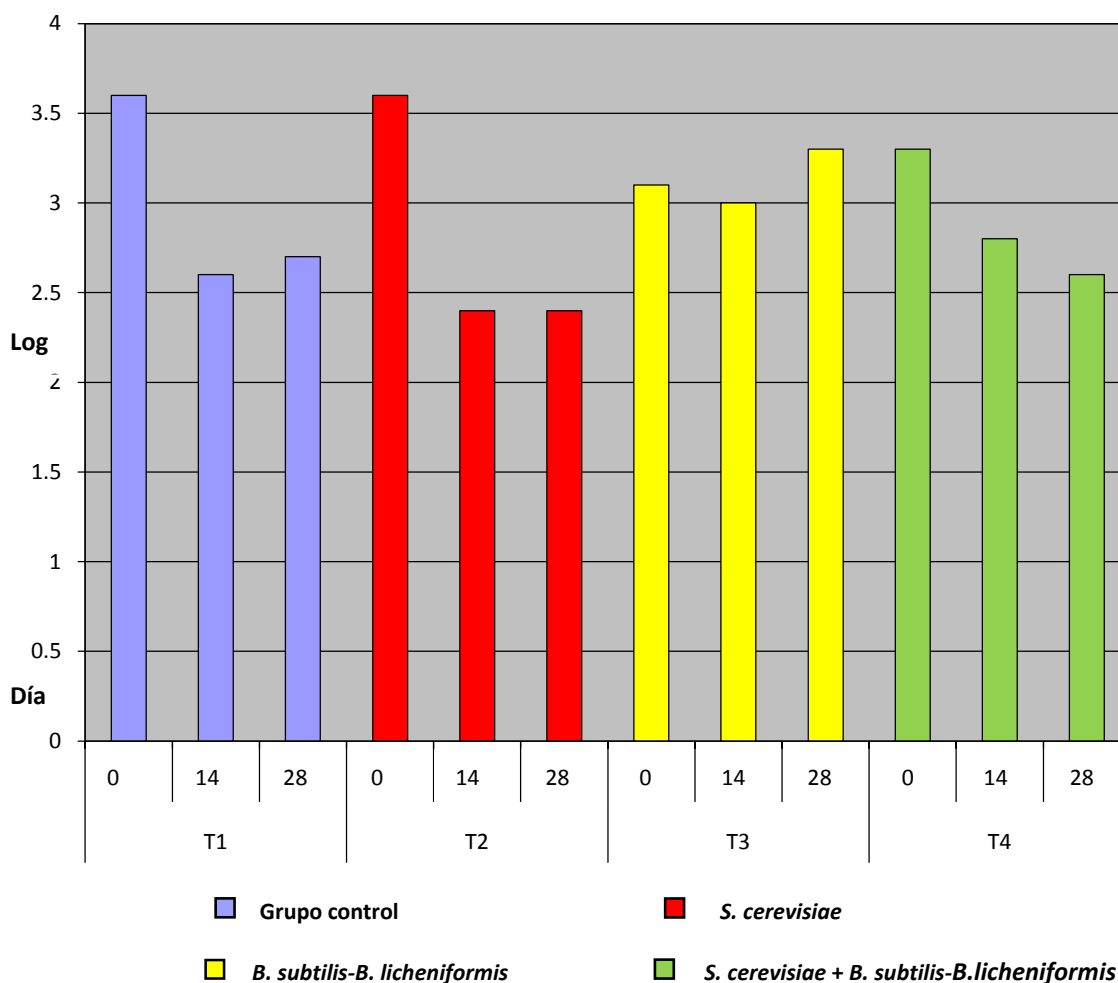
En la siguiente Grafica (4) muestra el promedio de los resultados del NMP determinando los efectos producidos por los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis*, *S. cerevisiae*, y la combinación de estos, en lechones durante la lactancia, en el cual muestra un ligero descenso en el número de UFC log/g de heces fecales, del día 14 al 28 para el tratamiento 3 en comparación con los demás tratamientos, ya que en los tratamiento 1,2 y 4 en vez de disminuir, aumenta el número de enterobacterias, pero cabe destacar que no es muy representativo el aumento.

Gráfica 4. Promedio de bacterias totales (UFC log/g de heces determinadas en lechones tratados con los probióticos *S. cerevisiae*, *B. subtilis*-*B. licheniformis* o la combinación de ambos durante la lactancia en los días 14 y 28 comparadas con un grupo control.



La grafica 5, muestra los promedios de los resultados producidos debido a los efectos de los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis*, *S. cerevisiae*, y la combinación de estos, en lechones destetados, en la cual muestra una disminución en el número de UFC log/g de heces fecales, para los tratamiento 1, 2 y 4 del día 0 de alimentación al día 28; Sin embargo para el tratamiento 3 la tendencia no es constante en los resultados pues no se observa una tendencia a disminuir el número de enterobacterias, en estos lechones.

Gráfica 5. Promedio de bacterias totales (UFC log/g de heces determinadas en lechones destetados tratados con los probióticos *S. cerevisiae*, *B. subtilis*-*B. licheniformis* o la combinación de ambos durante las diferentes fases de alimentación comparadas con un grupo control.



En la siguiente tabla 4 se resumen de manera general los resultados obtenidos de las otras técnicas aplicadas para determinar la cuantificación de mesófilos aerobios, identificación de enterobacterias e identificación de bacterias anaerobias, de las cerdas y lechones durante la lactancia y después del destete; en esta tabla se especifican, únicamente los promedios de la cuantificación de UFC log/g y se hace un resumen de las bacterias identificadas en los grupos de animales de forma general, tratados con las diferentes dietas.

En cuanto a todos los demás resultados, las tablas se muestran en el anexo de la Tabla 9 a la Tabla 29 donde se explica la forma en que están ordenadas, en estas podemos ver más ampliamente que logramos obtener a los *Bacillus* tanto en forma aeróbica como anaeróbica; también identificamos las enterobacterias, principalmente *E. coli* y *Salmonella sp.*, además de algunas bacterias anaeróbicas como lo son los género *Lactobacillus* y *Enterococcus*, pertenecientes a la flora normal del intestino de las cerdas y sus lechones.

Es importante hacer notar que en las Tablas 4 y de la 9 a la 29 los resultados que se registran acerca del conteo en placa de mesófilos aerobios solo se reportaron los de la dilución 10^{-3} debido a que en los resultados de las otras diluciones (0, 10^{-1} , 10^{-2}) en todos los casos fueron "incontables". Sin embargo, las placas con más de 250 colonias no pueden ser contadas y son designadas como "Incontables".

Tabla 4. Cuantificación e Identificación general de bacterias aerobias y anaerobias en cerdas y lechones.

Resumen y promedios generales de resultados obtenidos durante el desarrollo del experimento.

Día o fase	Tratamiento	Grupo de animales	NMP	Mesófilos aerobios			Identificación de microorganismos anaerobios	
			# UFC log/g de mtra.	UFC a 35°C	UFC a 25°C	Microorganismo identificado en AMC	AST	AS
Día 0	1	Cerdas	8.0	Incontables	Incontables	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Lactobacilos
	1	Lechones	-----	Incontables	Incontables	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora normal
	2	Cerdas	7.6	Incontables	Incontables	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora normal
	2	Lechones	-----	179	140	<i>S. paratyphi</i>	Enterobacterias	Flora normal
	3	Cerdas	8.0	Incontables	Incontables	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Lactobacilos
	3	Lechones	-----	Incontables		SC	Enterobacterias	Lactobacilos
	4	Cerdas	6.7	Incontables	Incontables	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora normal
	4	Lechones	-----	230	180	<i>E. coli</i>	SC	SC
Día 14	1	Lechones	8.5	Incontables	Incontables	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora normal
	2		8.4	Incontables	Incontables	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora normal
	3		9.0	Incontables	Incontables	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora normal
	4		8.4	Incontables	Incontables	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora normal
Día 28	1	Cerdas	7.7	Incontables	Incontables	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora normal
	1	Lechones	9.2	Incontables	346	<i>E. coli</i>	Flora normal	Lactobacilos
	2	Cerdas	6.5	154	44	<i>E. coli, S. paratyphi</i>	Enterobacterias	Lactobacilos
	2	Lechones	8.5	Incontables	Incontables	<i>E. coli</i>	Flora normal	Flora normal
	3	Cerdas	5.4	70	0	SC	<i>B. subtilis</i>	Flora normal
	3	Lechones	8.3	Incontables	Incontables	<i>E. coli</i>	Flora normal	Lactobacilos
	4	Cerdas	6.7	Incontables	Incontables	SC	<i>B. licheniformis</i>	Flora normal
	4	Lechones	8.7	Incontables	Incontables	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora normal
Fase 1	1	Lechones destetados	3.6	Incontables	Incontables	<i>S. paratyphi</i>	Lactobacilos	Flora normal
	2		3.6	Incontables	Incontables	<i>E. coli</i>	Lactobacilos	Flora normal
	3		3.1	Incontables	Incontables	SC	Lactobacilos	Flora normal
	4		3.3	Incontables	Incontables	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora normal
Fase 2	1	Lechones destetados	2.6	Incontables	249	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Lactobacilos
	2		2.4	Incontables	107	SC	Lactobacilos	Flora normal
	3		3.0	Incontables	172	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Lactobacilos
	4		2.8	Incontables	Incontables	SC	Flora normal	Lactobacilos
Fase 3	1	Lechones destetados	2.7	Incontables	145	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora normal
	2		2.4	Incontables	75	SC	Flora normal	Lactobacilos
	3		3.3	Incontables	41	SC	Flora normal	Lactobacilos
	4		2.6	Incontables	182	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	Flora normal

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Trypticaseina; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

5.0 DISCUSIÓN

Varias pruebas alimenticias han sido llevadas a cabo para evaluar los efectos de *B. subtilis*-*B. licheniformis* y *S. cerevisiae* en las dietas para cerdas lactantes y lechones durante la lactancia y al destete.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos proporcionan información sobre la actividad inhibitoria de enterobacterias, en cerdas lactantes, producida por *B. subtilis* - *B. licheniformis*, *S. cerevisiae* y la combinación de ambos, en comparación con un grupo control, Grafica 3; pudiéndose observar así una disminución de enterobacterias, específicamente, durante la lactación en las cerdas, y analizando los datos observamos que en el tratamiento 3 en donde se administró el probiótico con los *Bacillus*, es donde se encuentra una mayor disminución de UFC log/g de heces, de enterobacterias desde el día 0 al día 28 (destete).

Se desconocen muchos aspectos de los mecanismos de acción de los probióticos, parece que éstos impiden a los microorganismos patógenos colonizar el tracto digestivo, o al menos reducen su concentración o su producción de toxinas. Los resultados de un estudio llevado a cabo sugiere que los *Bacillus spp.*, no son parte de la microbiota indígena y no colonizan de manera fácil el tracto intestinal. Eso indica que los productos de los *Bacillus* pueden competir por nutrientes, o resultar en producción de una sustancia antibacterial. Asimismo, se han registrado aumentos de la concentración de inmunoglobulinas en el tracto digestivo de cerdos tras la administración de *B. subtilis*, por lo que otro efecto de los probióticos podría ser la estimulación del sistema inmunológico del animal. En forma general el resultado es que los animales que reciben estos probióticos presentan un mejor estado de salud que se puede traducir en una mejora del crecimiento (Rosen, 1995; Jonsson y Conway, 1992; Spriet et. al., 1987; Kornegay y Risley, 1996; Freter, 1992; Hentges, 1992; Tam et. al., 2006).

Para el tratamiento 2 es importante resaltar, que no pudimos aislar la levadura de las muestras obtenidas, esto es debido a que el medio no tenía las condiciones adecuadas, para el crecimiento de esta, ya que cuando realizamos los cultivos trabajamos con un medio caduco, y en posteriores cultivos del probiótico, que fueron realizados para determinar si la levadura tenía actividad, se utilizarón medios más recientes y en estos si pudimos aislar a *S. cerevisiae*, además

sabemos que si tuvo una actividad inhibitoria en las cerdas y lechones porque hay un descenso en el número de enterobacterias y según Castellanos, al adicionar la levadura en la dieta de cerdas en lactación disminuye la frecuencia de diarrea en la camada, y favorece el desarrollo de mucosa intestinal en los lechones durante la lactancia, estos resultados que reporta Castellanos pertenecen a otros objetivos del mismo trabajo de investigación que no fueron tratados en el presente trabajo. En el caso del tratamiento 4, que contenía los *Bacillus* y la levadura, se observan resultados constantes desde el día 0 al 28, y no podemos determinar con certeza si hay una disminución de las UFC log /g de heces(Castellanos, 2008),

En la grafica 4, se registraron las UFC log/g de heces de la población bacteriana del tracto gastrointestinal, por tratamiento en lechones durante la lactancia donde no se nota una inhibición menor del crecimiento de *enterobacterias*, a excepción del tratamiento 3 donde sí se puede observar una disminución con respecto a los resultados obtenidos en el tratamiento control, pero cabe destacar que según Wang la alimentación con el probiótico Bioplus 2B (*B. subtilis*-*B. licheniformis*) en las dietas de cerdos en crecimiento ha mostrado tener menos o respuestas negativas en el desarrollo, inmunidad e incremento en resistencia contra desórdenes intestinales, en comparación con cerdos jóvenes. Para los tratamiento 2 y 4 se observa que en vez de que haya una disminución de enterobacterias hay un ligero incremento, al comparar con el grupo control, pero se puede justificar este último, ya que según Swords, la colonización bacteriana en el intestino de los lechones es extremadamente rápida y de acuerdo a la Gráfica 1, tiene su mayor población bacteriana al día 28, por lo tanto no se puede observar con claridad el efecto, además las interacciones bacterianas involucran múltiples mecanismos. Estos pueden diferir de acuerdo con las especies de los huéspedes individuales y de la localización de las poblaciones bacterianas en el intestino. Por otra parte, los efectos de los probióticos son mucho más acusados en las primeras semanas de vida de los animales, especialmente en el período posterior al destete en el caso de los mamíferos (Wang, 2008; Swords, 1993; Cole 1984; Committe, 1999).

En la segunda fase del experimento, representada en la gráfica 5 encontramos que los efectos producidos en los lechones después del destete por las dietas administradas durante las etapas de alimentación (formuladas para satisfacer los requerimientos de los lechones), analizamos que en estas si se observa un efecto de inhibición de enterobacterias, puesto que si

vemos una disminución de UFC log/g de heces para los tratamientos 1, 2 y 4; en el tratamiento 1 se supone que debería ser constante la cantidad de bacterias, pero esta disminución se puede deber a que en las heces de los otros lechones sometidos a los diversos tratamientos se encuentren presentes los *Bacillus* o la levadura, y recientes evidencias, indican que *B. subtilis* puede completar su ciclo de vida entera dentro del tracto intestinal yendo de espora a célula vegetal y esporularse de nuevo, y de esta manera pueden estar contaminando los alimentos del tratamiento 1 a través de las esporas, considerando que la bacteria es encontrada en heces, entonces no es sorprendente que produzca un efecto de inhibición en los cerdos del tratamiento control (Tam, 2006; Hong, 2004 y 2005).

En cuanto a los tratamientos 2 y 4, que contienen *S. cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis* con *S. cerevisiae*, si hay una inhibición del crecimiento de enterobacterias, con respecto a los bacilos ya se explicaron anteriormente algunos de los mecanismos de inhibición, pero con respecto a la levadura, ésta tiene la capacidad de producir antibióticos naturales, ácido acético, ácido láctico y ácido fórmico en el tracto gastrointestinal, en concentraciones que no pueden tolerar los microorganismos causantes de enfermedades; además ataca la cápsula protectora de algunos microorganismos patógenos, aumentando su vulnerabilidad a la acción de defensas naturales. Todo esto hace que el ambiente del tubo digestivo sea menos propicio para los agentes infecciosos especialmente de los que requieren oxígeno; además agotan el suministro de ciertos elementos esenciales para la existencia de bacterias dañinas. Este efecto bacteriostático sobre la población bacteriana patógena permite incrementar la población microbiana normal, así como mantener un pH estable en el tracto gastrointestinal y reducir la tasa de mortalidad por problemas gastrointestinales; también mejora la conversión alimentaria, aporta enzimas como amilasas, proteasas y lipasas ausentes en la microflora intestinal del animal joven, incrementando la digestibilidad de la ración, especialmente en lo referente a proteína asimilable, utilización del almidón y el aprovechamiento de la energía de los lípidos.

Por estas razones al adicionarla en la dieta de los animales, la levadura ejerce acciones catalíticas que potencializan los procesos fisiológicos del aparato digestivo, favorece la eliminación e inhibición de algunos factores que hacen más lento el desarrollo, además de que estimulan la mitosis celular; por lo tanto si es suministrada diariamente, el cerdo puede obtener mejores resultados en la eficiencia alimenticia (García, 2000).

La variación en los resultados de estos estudios para el tratamiento 3 de la gráfica 5, puede ser atribuido a varios factores como, la dosis del los *Bacillus*, la composición de su dieta, forma de alimentación y la interacción con otros animales; además las estrategias de administración probiótica pueden también impactar los efectos el probiótico (Wang , 2008).

También la aplicación de bacterias probióticas que son producidas industrialmente “*in vivo*”, frecuentemente generan resultados muy variables. Un probiótico, el cual es efectivo en una camada en particular, podría no ser efectivo en otras. El tipo de probiótico escogido podría haber perdido potencia de alguna forma. Esto ha llevado a cierto grado de escepticismo de parte de grandes sectores agropecuarios y de las comunidades veterinarias, en lo que se refiere al valor real de las bacterias probióticas en la industria porcina.

De acuerdo a lo analizado anteriormente en el presente trabajo, si se logró cumplir con el objetivo, que es observar si hay un efecto de inhibición de enterobacterias, al adicionar *S. cerevisiae*, *B. subtilis*-*B. licheniformis* y la combinación de ambos en las dietas, pero es importante continuar con las investigaciones en este campo para tratar de identificar claramente los mecanismos de acción de los probióticos, e identificar las condiciones óptimas para su empleo, para que presenten un mayor efecto, además se considera que puede ser evaluado de nuevo para poder demostrar la eficacia de estos probióticos, determinando cuales son las condiciones de prueba óptimas para demostrar el efecto, ya que como se mencionó anteriormente, existen muchas variantes como lo son: las categorías de animales a quien va dirigido el estudio, (raza, edad, sexo, etc.), la composición del aditivo, propiedades químicas y biológicas, incompatibilidades con otros ingredientes alimenticios , dosificación, etc., que no dejan que el efecto se observe de una manera más clara, pero que si existe, entonces sería importante analizar a detalle estas condiciones y determinar cuáles son los puntos clave para obtener más beneficios y mejorar el desempeño de estos productos.

Es conveniente seguir las investigaciones con respecto al uso de *S. cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis* como probióticos para incluirlas en este tipo de productos, ya que aquí se comprobó que si inhiben el crecimiento de la *E. coli*, pero podría realizarse un estudio para comprobar si las bacterias entre ellas tienen un efecto antagónico con respecto a las otras. Aunque existen variantes se tendrían que aclarar en futuros experimentos.

6.0 CONCLUSIONES

La adición de *Saccharomyces cerevisiae*, como de *Bacillus subtilis* -*Bacillus licheniformis* o la combinación de estos, en la dieta de cerdas y lechones durante la lactancia, modificó la cantidad de enterobacterias (UFC log/g de heces), en el intervalo del día 0 al día 28 (destete).

La adición de *Saccharomyces cerevisiae*, como de *Bacillus subtilis* -*Bacillus licheniformis* o la combinación de estas, en la dieta de lechones durante las diferentes fases de alimentación en el destete disminuye la cantidad de enterobacterias en heces.

Se confirmó la presencia de los probióticos *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, también la identificación de bacterias aerobias y anaerobias pertenecientes a la flora normal aisladas en los cultivos bacteriológicos.

Se considera a los probióticos como la mejor opción para la prevención de la diarrea, ya que no agreden las condiciones óptimas del intestino y no causan una disminución en el peso de los animales, así como también se ha demostrado que contribuyen a una mejor absorción de los nutrientes y todo esto se manifiesta como una mayor resistencia a las bacterias patógenas. Al controlar los cuadros de esta enfermedad las pérdidas económicas disminuirían considerablemente.

7.0 ANEXO

7.1 Tablas del contenido de dietas para la alimentación de cerdos y lechones en experimentación. En este apartado se muestran las tablas de la 4 a la 7, especificando el contenido del alimento para los diferentes grupos de animales y fases del experimento, las cuales están formuladas para satisfacer sus necesidades nutricionales; la tabla 4 muestra la dieta a la que fueron sometidos los cerdos hembra durante la lactancia, y de la tabla 5 a la 7 se especifica la dieta administrada a los lechones después del destete.

Tabla 5. Dieta administrada a las cerdas durante la lactancia.

Ingredientes	T1	T2	T3	T4
SORGO	582,780	579,780	582,780	579,280
SOYA, PASTA 46%	230,800	230,800	230,800	230,800
AZUCAR	50,000	50,000	50,000	50,000
SEBO	46,800	46,800	46,800	46,800
MELAZA, CA-80BRX	30,000	30,000	30,000	30,000
ORTOFOSFATO	19,600	19,600	19,600	19,600
CANOLA, PASTA-36	18,400	18,400	18,400	18,400
CALCIO-CARBONATO	7,600	7,600	7,600	7,600
SAL,NACI-I	4,000	4,000	4,000	4,000
Vitaminas pmx U-058	3,000	3,000	3,000	3,000
L-LISINA.HCl	2,220	2,220	2,220	2,220
Vitaminas pmx U-059	2,000	2,000	2,000	2,000
L-TREONINA	1,550	1,550	1,550	1,550
Minerales pmx U-060	0.800	0.800	0.800	0.800
DL-METIONINA	0.450	0.450	0.450	0.450
Levadura Procreatin-7	0.000	3,000	0.000	3,000
Bioplus 2	0.000	0.000	0.500	0.500
TOTAL	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0

T1= Dieta control; **T2** = Dieta control + S. cerevisiae; **T3** = Dieta control + B. licheniformis y B. subtilis; **T4=** Dieta control + S. cerevisiae, B. licheniformis y B. subtilis

Tabla 6. Dieta administrada a los lechones destetados fase 1.

Ingredientes	T1	T2	T3	T4
SORGO	395.20	392.20	394.70	391.70
SUERO DE LECHE	270.00	270.00	270.00	270.00
PASTA DE SOYA	190.00	190.00	190.00	190.00
SEBO	63.00	63.00	63.00	63.00
PLASMA ADH	40.00	40.00	40.00	40.00
ORTOFOSFATO	12.70	12.70	12.70	12.70
CALCIO- CARBONATO	5.70	5.70	5.70	5.70
L-LISINA	5.70	5.70	5.70	5.70
SAL	4.00	4.00	4.00	4.00
OXIDO DE ZINC	4.00	4.00	4.00	4.00
Vitaminas U-058	2.40	2.40	2.40	2.40
L-TREONINA	2.20	2.20	2.20	2.20
Vitaminas U-059	2.00	2.00	2.00	2.00
DL-METIONINA	1.90	1.90	1.90	1.90
Minerales 060	1.20	1.20	1.20	1.20
PROCREATIN 7	0.00	3.00	0.00	3.00
BIOPLUS 2B	0.00	0.00	0.50	0.50
TOTAL	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0

T1= Dieta control; T2 = Dieta control + S. cerevisiae; T3 = Dieta control + B. licheniformis y B. subtilis; T4= Dieta control + S. cerevisiae, B. licheniformis y B. subtilis

Tabla 7. Dieta administrada a los lechones destetados fase 2.

Ingredientes	T1	T2	T3	T4
SORGO, GRANO 9%	582,780	579,780	582,780	579,280
SOYA, PASTA 46%	230,800	230,800	230,800	230,800
LECHE, SUERO DSH	50,000	50,000	50,000	50,000
SEBO	46,800	46,800	46,800	46,800
ORTOFOSFATO	30,000	30,000	30,000	30,000
CALCIO-CARBONATO	19,600	19,600	19,600	19,600
L-LISINA.HCl	18,400	18,400	18,400	18,400
SAL,NACl-I	7,600	7,600	7,600	7,600
ZN O Oxido de Zinc	4,000	4,000	4,000	4,000
DL-METIONINA	3,000	3,000	3,000	3,000
L-TREONINA	2,220	2,220	2,220	2,220
VITAMINAS	2,000	2,000	2,000	2,000
Vitaminas 058	1,550	1,550	1,550	1,550
MINERALES	0.800	0.800	0.800	0.800
PROCREATIN 7	0.000	3,000	0.000	3,000
BIOPLUS 2B	0.000	0.000	0.500	0.500
TOTAL	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0

T1= Dieta control; T2 = Dieta control + S. cerevisiae; T3 = Dieta control + B. licheniformis y B. subtilis; T4= Dieta control + S. cerevisiae, B. licheniformis y B. subtilis.

Tabla 8. Dieta administrada a los lechones destetados fase 3.

Ingredientes	CI	CL	CB	CLB
SORGO, GRANO 9%	679,380	675,880	678,880	675,380
SOYA, PASTA 46%	230,000	230,000	230,000	230,000
SEBO	45,800	45,800	45,800	45,800
ORTOFOSFATO	17,400	17,400	17,400	17,400
CALCIO-CARBONATO	10,100	10,100	10,100	10,100
SAL,NACI-I	4,000	4,000	4,000	4,000
L-LISINA.HCI	3,310	3,310	3,310	3,310
ZN O Oxido de Zinc	3,000	3,000	3,000	3,000
L-TREONINA	2,250	2,250	2,250	2,250
VITAMINAS	2,000	2,000	2,000	2,000
MINERALES	2,000	2,000	2,000	2,000
DL-METIONINA	0.630	0.630	0.630	0.630
ENDOX	0.130	0.130	0.130	0.130
PROCREATIN 7	0.000	3,500	0.000	3,500
BIOPLUS 2B	0.000	0.000	0.500	0.500
TOTAL	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0

T1= Dieta control; T2 = Dieta control + S. cerevisiae; T3 = Dieta control + B. licheniformis y B. subtilis;T4= Dieta control + S. cerevisiae, B. licheniformis y B. subtilis

7.2. Tablas de cuantificación e identificación de bacterias aerobias y anaerobias en heces fecales determinados a través de cultivos bacteriológicos en cerdos hembra y lechones durante la lactancia y después del destete. A continuación se describen las tablas de resultados obtenidos a partir de la aplicación de las diferentes técnicas de cultivos bacteriológicos para la cuantificación e identificación de bacterias, además de la confirmación de los probióticos en heces fecales.

7.2.1 Tablas de resultados de cerdos hembra del día 0 y 28 tratados con las diferentes dietas. De la tabla 9 a la 1 se reportan los resultados de las muestras del día 0 de los cerdos hembra, cada tabla representa una parte de las cerdas tratadas y estas están divididas en 3 bloques; los datos obtenidos de la muestra del día 28 están reportados de la tabla 12 a la 14.

Tabla 9. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de cerdos hembra del día 0 durante la lactancia, bloque 1 (Fecha: 15/11/07). Registro del UFC log/g de heces, Mésofilos aerobios, Identificación de enterobacteria y microorganismos anaeróbicos, además se confirma la presencia de los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P UFC/g de mtra.	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
			35°C UFC	25°C UFC	Microorganismo Identificado	AMC	AST	AS
T1	1.03	2.5 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Lactobacilos
T1	1.01	1.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal y Lactobacilos
T2	1.05	5.0 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal
T2	1.01	1.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal
T2	10.2	4.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T3	1.03	3.3 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal
T3	1.09	9.8 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Lactobacilos
T3	1.02	2.7 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal y Lactobacilos
T4	1.06	1.5 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal
T4	1.01	2.1 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Trypticaseina; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tabla 10. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de cerdos hembra del día 0 durante la lactancia, bloque 2 (Fecha: 19/12/07). Registro del UFC log/g de heces, Mésofilos aerobios, Identificación de enterobacteria y microorganismos anaeróbicos, además se confirma la presencia de los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
		UFC/g de mtra.	35°C UFC	25°C UFC	Identificación de mesofilos	AMC	AST	AS
T1	1.07	9.8×10^8	Incontables	89	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y Lactobacilos	Enterobacterias y Lactobacilos
T1	1.05	5.0×10^8	130	82	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y Lactobacilos	Flora Normal, Enterobacterias y Lactobacilos
T1	1.06	1.5×10^8	Incontables	160	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T1	1.06	1.5×10^9	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T2	1.03	2.5×10^6	179	140	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias y Lactobacilos
T2	1.06	2.1×10^8	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T2	1.06	1.3×10^8	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T3	1.06	2.1×10^8	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	SC
T3	1.1	6.5×10^8	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y Lactobacilos	Enterobacterias y Lactobacilos
T3	1.01	9.7×10^7	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	SC	SC
T4	1.02	6.5×10^8	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T4	1	2.1×10^7	57	48	SC	SC	SC	SC
T4	1.12	2.6×10^7	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y Lactobacilos	Enterobacterias y Lactobacilos

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Tripticaseina; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tabla 11. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de cerdos hembra del día 0 durante la lactancia, bloque 3 (Fecha: 22/01/08). Registro del UFC log/g de heces, Mesófilos aerobios, Identificación de enterobacteria y microorganismos anaeróbicos, además se confirma la presencia de los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
		UFC/g de mtra.	35°C UFC	25°C UFC	Identificación de mesofilos	AMC	AST	AS
T1	1,2	2.4×10^6	88	96	SC	SC	Lactobacilos	Lactobacilos
T1	1	9.8×10^6	Incontables	10	SC	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T2	1,06	$8,8 \times 10^5$	Incontables	40	SC	<i>E. coli</i>	Lactobacilos	Lactobacilos
T2	1,01	9.8×10^7	Incontables	45	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y Flora Normal	Enterobacterias y Flora Normal
T2	1,012	6.6×10^6	154	44	SC	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T3	1,03	2.4×10^6	Incontables	30	SC	SC	Lactobacilos	Lactobacilos
T3	1,3	1.5×10^7	Incontables	37	SC	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T3	1,02	1.6×10^7	17	8	SC	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Lactobacilos
T4	1,1	1.5×10^6	27	3	SC	SC	Lactobacilos	SC
T4	1,01	1.5×10^6	26	31	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T4	0,96	5.0×10^6	Incontables	128	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T4	1	0	63	14	SC	SC	SC	Flora Normal

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Trypticaseina; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tabla 12. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de cerdos hembra del día 28 durante la lactancia, bloque 1 (Fecha: 07/12/07). Registro del UFC log/g de heces, Mésofilos aerobios, Identificación de enterobacteria y microorganismos anaeróbicos, además se confirma la presencia de los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P UFC/g de mtra.	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
			35°C UFC	25°C UFC	Microorganismo Identificado		AMC	AST
T1	1.03	9.8 x 10 ⁶	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T1	1.02	2.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	SC	Flora Normal
T2	1.02	9.8 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	<i>S. paratyphi</i> y <i>E. coli</i>	Enterobacterias	Lactobacilos y Enterobacterias
T2	1.05	0	23	0	SC	SC	SC	Lactobacilos
T2	1.03	9.8 x 10 ⁶	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Lactobacilos y Enterobacterias
T3	1.03	2.5 x 10 ⁶	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	SC	Genero <i>Bacillus</i>	Lactobacilos
T3	1.02	3.4 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Genero <i>Bacillus</i>	Flora Normal y Enterobacterias
T3	1.02	0	4	0	SC	SC	SC	Flora Normal
T4	1.07	6.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Genero <i>Bacillus</i>	Lactobacilos y Enterobacterias
T4	1.15	9.8 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Genero <i>Bacillus</i>	Flora Normal, Enterobacterias y Lactobacilos

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Trypticaseina; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tabla 13. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de cerdos hembra del día 28 durante la lactancia, bloque 2 (Fecha: 17/01/08). Registro del UFC log/g de heces, Mésofilos aerobios, Identificación de enterobacteria y microorganismos anaeróbicos, además se confirma la presencia de los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
		UFC/g de mtra.	35°C UFC	25°C UFC	Identificación de mesofilos	AMC	AST	AS
T1	1.02	6.5 x 10 ⁷	Incontables	0	SC	SC	Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T1	1.09	9.0 x 10 ⁶	Incontables	5	SC	SC	Lactobacilos	Enterobacterias
T1	1.28	2.7 x 10 ⁷	0	0	SC	SC	Enterobacterias y lactobacilos	Flora Normal
T1	1.01	4.3 x 10 ⁷	112	0	SC	SC	Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T2	1.09	2.6 x 10 ⁷	43	22	SC	SC	SC	Enterobacterias
T2	1.03	2.0 x 10 ⁶	0	0	SC	SC	Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T2	1.01	9.8 x 10 ⁶	98	3	SC	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T3	1.07	0	0	0	SC	SC	Flora Normal	SC
T3	1	2.1 x 10 ⁸	70	0	SC	SC	Enterobacterias y lactobacilos	Lactobacilos
T3	1.06	4.6 x 10 ⁶	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	SC	SC
T4	1.02	0	0	0	SC	SC	Lactobacilos	Lactobacilos
T4	1.02	2.1 x 10 ⁹	Incontables	4	SC	SC	Lactobacilos	Lactobacilos
T4	1.04	1.3 x 10 ⁶	0	0	SC	SC	Lactobacilos	Lactobacilos

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Trypticaseina; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tabla 14. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de cerdos hembra del día 28 durante la lactancia, bloque 3 (Fecha: 20/02/08). Registro del UFC log/g de heces, Mésofilos aerobios, Identificación de enterobacteria y microorganismos anaeróbicos, además se confirma la presencia de los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
		UFC/g de mtra.	35°C UFC	25°C UFC	Identificación de mesofilos	AMC	AST	AS
T1	1,12	9.8 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	SC	Flora Normal y Lactobacilos	SC
T1	1,09	1.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T2	1,05	6.5 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	SC	Flora Normal y Enterobacterias
T2	1,03	4.6 x 10 ⁷	Incontables	40	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	Flora Normal	SC
T2	1,3	2.8 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i>	SC	Flora Normal	SC
T3	1,01	4.6 x 10 ⁶	Incontables	21	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	SC	Flora Normal	Lactobacilos
T3	1	3,8 x 10 ⁵	Incontables	25	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	SC	SC	SC
T3	1,02	9.8 x 10 ⁶	Incontables	100	<i>B. licheniformis</i>	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T4	1,03	4.6 x 10 ⁶	Incontables	115	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	SC	Flora Normal	SC
T4	1,1	1.6 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	SC
T4	1,06	1.6 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal
T4	1	6.6 x 10 ⁶	Incontables	Incontables	<i>B. licheniformis</i>	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Trypticaseina; **AS**= Agar Sangre
T1= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

7.2.2 Tablas de resultados de lechones del día 0, 14 y 28 durante la lactancia. De la tabla 15 a la 17 se reportan los resultados de las muestras del día 0 de los lechones durante la lactancia, en estas tablas no se reporta las UFC debido a que la muestra no fue suficiente y fue tomada con isopo, cada tabla representa una parte de los lechones y estos están divididos en 3 bloques; los datos obtenidos de la muestra del día 14 están reportados de la tabla 18 a la 20; así mismo en de la tabla 21 a la 23 reporta los resultados de la muestra del día 28.

Tabla 15. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 0, “isopo” durante la lactancia, bloque 1 (Fecha: 15/11/07). Registro del UFC log/g de heces, Mésofilos aerobios, Identificación de enterobacteria y microorganismos anaeróbicos, además se confirma la presencia de los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P UFC/g de mtra.	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
			35°C UFC	25°C UFC	Microorganismo Identificado	AMC	AST	AS
T1	-----	-----	3	0	SC	SC	SC	Flora Normal
T1	-----	-----	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal
T2	-----	-----	20	4	SC	SC	SC	Flora Normal
T2	-----	-----	23	21	SC	SC	SC	Flora Normal
T2	-----	-----	4	2	SC	SC	SC	SC
T3	-----	-----	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal
T3	-----	-----	6	3	SC	SC	SC	Flora Normal
T3	-----	-----	5	2	SC	SC	SC	SC
T4	-----	-----	230	180	SC	SC	SC	Flora Normal
T4	-----	-----	0	0	SC	SC	SC	SC

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Trypticaseina; **AS**= Agar Sangre **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tabla 16. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 0, "isopo" durante la lactancia, bloque 2 (Fecha: 19/12/07). Registro del UFC log/g de heces, Mésofilos aerobios, Identificación de enterobacteria y microorganismos anaeróbicos, además se confirma la presencia de los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
		UFC/g de mtra.	35°C UFC	25°C UFC	Identificación de mesofilos	AMC	AST	AS
T1	-----	-----	Incontables	40	SC	SC	SC	SC
T1	-----	-----	4	1	SC	<i>E. coli</i>	SC	SC
T1	-----	-----	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y lactobacilos	Enterobacterias
T1	-----	-----	110	86	SC	SC	SC	SC
T2	-----	-----	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T2	-----	-----	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T2	-----	-----	34	30	SC	SC	SC	SC
T3	-----	-----	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T3	-----	-----	11	3	SC	SC	SC	SC
T3	-----	-----	3	0	SC	SC	SC	SC
T4	-----	-----	0	0	SC	SC	SC	SC
T4	-----	-----	0	0	SC	SC	SC	SC
T4	-----	-----	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias

NMP = Numero más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Trypticaseína; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tabla 17. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 0, "isopo" durante la lactancia, bloque 3 (Fecha: 22/01/08). Registro del UFC log/g de heces, Mésofilos aerobios, Identificación de enterobacteria y microorganismos anaeróbicos, además se confirma la presencia de los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
			UFC/g de mtra.	35°C UFC	25°C UFC		Identificación de mesofilos	AMC
T1	-----	-----	84	95	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Enterobacterias
T1	-----	-----	2	SC	SC	SC	SC	SC
T2	-----	-----	2	SC	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal	Flora Normal y Lactobacilos
T2	-----	-----	SC	SC	SC	SC	SC	SC
T2	-----	-----	8	4	SC	SC	SC	Flora Normal
T3	-----	-----	SC	SC	SC	SC	Flora Normal y Enterobacterias	SC
T3	-----	-----	SC	SC	SC	SC	Lactobacilos	Lactobacilos
T3	-----	-----	SC	SC	SC	SC	SC	Flora Normal
T4	-----	-----	73	82	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal
T4	-----	-----	20	13	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T4	-----	-----	SC	SC	SC	SC	SC	Lactobacilos
T4	-----	-----	Incontables	126	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Nomal

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Trypticaseina; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tabla 18. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 14, durante la lactancia, bloque 1 (Fecha: 30/11/07). Registro del UFC log/g de heces, Mésofilos aerobios, Identificación de enterobacteria y microorganismos anaeróbicos, además se confirma la presencia de los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P UFC/g de mtra.	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
			35°C UFC	25°C UFC	Microorganismo identificado	AMC	AST	AS
T1	0.98	5.0 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal
T1	1.04	4.9 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal y Lactobacilos
T2	1.01	3.4 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal y Lactobacilos
T2	1.01	2.0 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal y Lactobacilos
T2	1.01	2.0 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal Lactobacilos
T3	0.87	2.8 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	<i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal
T3	0.73	4.6 x 10 ¹⁰	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	y Lactobacilos
T3	1.01	1.6 x 10 ¹⁰	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	y Lactobacilos
T4	0.68	3.4 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal
T4	0.22	1.4 x 10 ⁶	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Tripticaseina; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tabla 19. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 14, durante la lactancia, bloque 2 (Fecha: 17/01/08). Registro del UFC log/g de heces, Mésofilos aerobios, Identificación de enterobacteria y microorganismos anaeróbicos, además se confirma la presencia de los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P UFC/g de mtra.	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
			35°C UFC	25°C UFC	Identificación de mesofilos	AMC	AST	AS
T1-14	1.01	9.7 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T1-14	1.01	2.1 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T1-14	1.01	1.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	SC
T1-14	1.06	9.8 x 10 ⁸	27	0	SC	<i>E. coli inactiva</i>	Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T2-14	1	4.6 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli inactiva</i>	Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T2-14	1.09	1.3 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T2-14	1.07	6.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T3-14	1.01	2.4 x 10 ⁶	0	0	SC	SC	Flora Normal	Flora Normal
T3-14	1.14	4.6 x 10 ¹⁰	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Enterobacterias
T3-14	1.6	9.8 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Enterobacterias
T4-14	1.03	6.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T4-14	1.07	1.3 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T4-14	1.02	7.4 x 10 ⁷	0	0	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Trypticaseina; **AS**=Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tabla 20. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 14 durante la lactancia, bloque 3 (Fecha: 06/01/08). Registro del UFC log/g de heces, Mésofilos aerobios, Identificación de enterobacteria y microorganismos anaeróbicos, además se confirma la presencia de los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
		UFC/g de mtra.	35°C UFC	25°C UFC	Identificación de mesofilos	AMC	AST	AS
T1	1,03	2.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y Flora Normal	Enterobacterias y Flora Normal
T1	1,13	4.6 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y Flora Normal	Enterobacterias y Flora Normal
T2	1,04	2.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y Flora Normal	Enterobacterias y Lactobacilos
T2	1	2.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	SC	Enterobacterias	Flora Normal y Lactobacilos
T2	1,06	5.4 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	SC	Enterobacterias	Enterobacterias y Lactobacilos
T3	1,07	9.8 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y Flora Normal	Enterobacterias y Flora Normal
T3	1,06	2.1 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T3	1,03	2.6 x 10 ⁸	260	Incontables	SC	SC	SC	SC
T4	1,09	6.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y Flora Normal	Flora Normal y Lactobacilos
T4		1.4 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y Flora Normal	Enterobacterias y Flora Normal
T4	0,98	1.2 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y Flora Normal	Enterobacterias y Flora Normal
T4	1,02	4.3 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y Flora Normal	Enterobacterias y Flora Normal

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Tripticaseina; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tabla 21. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 28 durante la lactancia, bloque 1 (Fecha: 07/12/07). Registro del UFC log/g de heces, Mésofilos aerobios, Identificación de enterobacteria y microorganismos anaeróbicos, además se confirma la presencia de los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P UFC/g de mtra.	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
			35°C UFC	25°C UFC	Microorganismo Identificado		AMC	AST
T1	1	2.6 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Lactobacilos
T1	0.46	4.6 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal
T2	0.23	6.6 x 10 ⁶	Incontables	346	SC	SC	Enterobacterias	Flora Normal
T2	0.7	4.9 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal
T2	0.66	9.8 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Lactobacilos
T3	0.87	1.4 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal
T3	0.97	5.0 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal
T3	0.89	4.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	
T4	0.45	5.0 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i>	<i>S. sonnei</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Lactobacilos
T4	0.91	2.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Lactobacilos

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Tripticaseina; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tabla 22. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 28 durante la lactancia, bloque 2 (Fecha: 17/01/08). Registro del UFC log/g de heces, Mésofilos aerobios, Identificación de enterobacteria y microorganismos anaeróbicos, además se confirma la presencia de los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P UFC/g de mtra.	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos AMC	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
			35°C UFC	25°C UFC	Identificación de mesofilos		AST	AS
T1	1.01	2.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T1	1.02	1.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T1	1.02	4.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	SC	SC	SC
T1	1.06	4.6 x 10 ¹⁰	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T2	1.08	1.5 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T2	1.06	4.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T2	1.12	1.5 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T3	1.04	2.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T3	1.06	9.0 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T3	1.03	4.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal y Lactobacilos
T4	1.07	9.8 x 10 ⁸	42	2	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T4	1.03	5.0 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias y Lactobacilos
T4	1.01	2.5 x 10 ⁷	217	162	SC	SC	Flora Normal	Flora Normal

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Tripticaseina; **AS**=Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tabla 23. Cuantificación e identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones del día 28 durante la lactancia, bloque 3 (Fecha: 06/01/08). Registro del UFC log/g de heces, Mésofilos aerobios, Identificación de enterobacteria y microorganismos anaeróbicos, además se confirma la presencia de los probióticos *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
		UFC/g de mtra.	35°C UFC	25°C UFC	Identificación de mesofilos	AMC	AST	AS
T1	1	9.8 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal
T1	0,2	5.4 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T2	1	2.1 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i>	SC	Flora Normal y Enterobacterias	Lactobacilos
T2	1	1.5 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i>	SC	Flora Normal	Flora Normal
T2	1,2	3.4 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T3	1	4.3 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y Lactobacilos	Enterobacterias y Lactobacilos
T3	0,6	1.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	SC	Flora Normal	Flora Normal y Lactobacilos
T3	0,7	4.6 x 10 ⁶	60	40	<i>B. licheniformis</i>	SC	Flora Normal	Flora Normal y Lactobacilos
T4	0,5	1.6 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T4	0,2	1.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T4	1,01	1.6 x 10 ¹⁰	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T4	1	6.3 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Trypticaseina; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

7.2.3 Tablas de resultados de lechones destetados durante las 3 fases de alimentación. En este apartado las tablas 23 a la 25 corresponde a el primer bloque de lechones destetados durante las 3 fases de alimentación con los probióticos; los resultados obtenidos del segundo bloque los contienen las tablas de la 25 a la 28.

Tabla 24. Cuantificación e Identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones destetados de la 1° fase del primer bloque (Fecha: 20/02/08)

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
		UFC/g de mtra.	35°C UFC	25°C UFC	Identificación de mesofilos	MC	AST	AS
T1	0.99	9.8 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal	Flora Normal
T1	1.1	3.4 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	<i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Flora Normal	Flora Normal
T1	1.06	3.4 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	<i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Flora Normal	Flora Normal
T1	1.04	3.4 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	<i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T2	0.54	1.6 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal	Flora Normal
T2	1.12	9.8 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T2	1.11	4.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	Flora Normal	Flora Normal
T3	0.93	5.4 x 10 ⁶	Incontables	Incontables	<i>B. licheniformis</i>	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T3	0.9	2.1 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T3	0.96	1.5 x 10 ⁷	Incontables	180	SC	SC	Flora Normal	Flora Normal
T3	0.88	9.8 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T3	0.95	2.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T4	1	5.4 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T4	1.1	5.9 x 10 ⁵	130	103	<i>B. licheniformis</i>	SC	SC	Flora Normal
T4	1.03	3.4 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T4	1.11	1.4 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	<i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal y
T4	1	3.8 x 10 ⁵	70	50	<i>B. licheniformis</i>	SC	SC	SC

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Trypticaseina; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tabla 25. Cuantificación e Identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones destetados de la 2° fase del primer bloque (Fecha: 04/03/08)

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P UFC/g de mtra.	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
			35°C UFC	25°C UFC	Identificación de mesofilos	MC	AST	AS
T1	0.98	4.6 x 10 ⁷	Incontables	403	SC	SC	Lactobacilos	Lactobacilos
T1	1.02	6.2 x 10 ⁷	Incontables	411	SC	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Lactobacilos
T1	1.1	6.2 x 10 ⁷	Incontables	15	SC	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal
T1	1.05	2.5 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	SC	SC	Flora Normal y Lactobacilos
T2	0.87	4.6 x 10 ⁷	Incontables	25	SC	SC	Lactobacilos	Lactobacilos
T2	1.06	4.6 x 10 ⁶	Incontables	57	SC	SC	Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T2	1.01	6.5 x 10 ⁷	Incontables	194	SC	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Lactobacilos
T3	1.1	2.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y lactobacilos	Enterobacterias y lactobacilos
T3	1.06	6.5 x 10 ⁷	Incontables	64	<i>B. licheniformis</i>	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Lactobacilos
T3	1.06	2.6 x 10 ⁸	Incontables	172	SC	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Lactobacilos
T3	1.07	4.6 x 10 ⁸	Incontables	47	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Lactobacilos
T3	1.05	4.6 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Lactobacilos
T4	1.12	1.6 x 10 ⁸	Incontables	140	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Lactobacilos
T4	1.03	4.6 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	<i>B. licheniformis</i>	SC	SC	Lactobacilos
T4	1.01	4.6 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	SC	SC	Lactobacilos
T4	1.06	3.4 x 10 ⁷	Incontables	86	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Lactobacilos
T4	1.11	2.8 x 10 ⁹	Incontables	179	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y lactobacilos	Lactobacilos

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Tripticaseina; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tabla 26. Cuantificación e Identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones destetados de la 3° fase del primer bloque (Fecha: 11/03/08)

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P UFC/g de mtra.	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
			35°C UFC	25°C UFC	Identificación de mesofilos		MC	AST
T1	1.05	1.6 x 10 ⁸	Incontables	145	<i>B. licheniformis</i>	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Lactobacilos
T1	0.98	4.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	<i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T1	0.96	4.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	<i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T1	1	2.1 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	<i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Enterobacterias, Lactobacilos y Flora Normal
T2	1.03	9.8 x 10 ⁶	Incontables	35	<i>B. licheniformis</i>	SC	Lactobacilos	Lactobacilos
T2	1.02	4.6 x 10 ⁶	Incontables	SC	SC	SC	SC	Lactobacilos
T2	1.01	4.6 x 10 ⁸	Incontables	SC	SC	SC	Flora Normal	Lactobacilos
T3	0.95	1.3 x 10 ⁸	Incontables	87	<i>B. licheniformis</i>	SC	Flora Normal	Lactobacilos
T3	0.9	2.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal	Flora Normal
T3	1.06	4.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal	Enterobacterias, Lactobacilos y Flora Normal
T3	1.04	5.0 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal	Flora Normal y Lactobacilos
T3	1.12	1.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Lactobacilos	Lactobacilos
T4	1.06	6.2 x 10 ⁷	Incontables	41	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	SC	SC	Lactobacilos
T4	1.08	6.2 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Flora Normal	Flora Normal y Lactobacilos
T4	1.03	1.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal	Flora Normal y Lactobacilos
T4	0.9	1.6 x 10 ⁸	Incontables	182	<i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T4	1	4.9 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Trypticaseina; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

Tabla 27. Cuantificación e Identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones destetados de la 1° fase del segundo bloque (Fecha: 17/01/08).

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
		UFC/g de mtra.	35°C UFC	25°C UFC	Identificación de mesofilos	MC	AST	AS
T1	1.03	4.6 x 10 ⁶	188	79	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T1	1.06	26 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T1	1.06	2.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y lactobacilos	Enterobacterias y lactobacilos
T1	1.01	6.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal
T1	1.01	2.7 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T1	1.09	5.4 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T1	1.08	1.5 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T2	1.04	3.3 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T2	1.06	5.4 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Enterobacterias y lactobacilos
T2	1.03	2.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y lactobacilos	Flora Normal y Enterobacterias
T2	1.01	2.6 x 10 ⁷	248	0	SC	SC	SC	SC
T3	1.03	3.3 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T3	1.05	4.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal
T3	1.01	4.6 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal y Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T3	1.09	6.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal
T3	1.03	4.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Enterobacterias
T4	1.12	1.5 x 10 ⁹	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal y Enterobacterias
T4	1.03	9.0 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal
T4	1.06	6.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	SC	SC	SC
T4	1.01	2.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Flora Normal

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Trypticaseina; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformi*

Tabla 28. Cuantificación e Identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en heces de lechones destetados de la 2° fase del bloque 2 (Fecha: 11/02/08).

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P UFC/g de mtra.	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
			35°C UFC	25°C UFC	Identificación de mesofilos	MC	AST	AS
T1	1.01	5.4 x 10 ⁷	Incontables	59	SC	SC	Lactobacilos	Lactobacilos
T1	1.07	1.5 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Flora Normal, Enterobacterias	Flora Normal y Lactobacilos
T1	1.09	2.6 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC		Enterobacterias	Enterobacterias
T1	1.03	2.1 x 10 ⁷	Incontables	121	<i>B. licheniformis</i>	SC	Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T1	1.04	9.0 x 10 ⁶	Incontables	90	<i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y lactobacilos	Enterobacterias y lactobacilos
T1	1.02	4.6 x 10 ⁷	Incontables	50	SC	SC	Lactobacilos	Flora Normal
T1	1.01	6.6 x 10 ⁶	Incontables	249	SC	SC	Lactobacilos	Flora Normal
T2	1.01	2.7 x 10 ⁷	Incontables	35		SC	Lactobacilos	Lactobacilos
T2	1.02	1.3 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y lactobacilos	Enterobacterias y lactobacilos
T2	1.06	4.6 x 10 ⁷	Incontables	19	SC	SC	Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T2	1.05	1.3 x 10 ⁷	Incontables	107	<i>B. subtilis</i>	SC	Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T3	1.01	4.6 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T3	1	9.8 x 10 ⁶	Incontables	127	<i>Bacillus</i>	SC	Flora Normal y Lactobacilos	Lactobacilos
T3	1.03	1.5 x 10 ⁸	120	98	SC	SC	Lactobacilos	Lactobacilos
T3	1.09	5.0 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	<i>Bacillus</i>	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T3	1.11	2.1 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	<i>E. coli</i>	Enterobacterias y lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T4	1.02	6.5 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	Flora Normal y Lactobacilos
T4	1.02	9.8 x 10 ⁶	Incontables	68	<i>Bacillus</i>	SC	Lactobacilos	Lactobacilos
T4	1.01	6.5 x 10 ⁷	Incontables	29	SC	SC	Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T4	1	9.8 x 10 ⁶	Incontables	Incontables	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	Enterobacterias	Lactobacilos

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Tripticaseina; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*

Tabla 29. Cuantificación e Identificación de bacterias totales aerobias y anaerobias en lechones destetados de la 3° fase del segundo bloque (Fecha: 11/02/08).

Tratamiento	Peso mtra (g)	N M P	Mesofilos Aerobios			Identificación de microorganismos	Identificación de Microorganismos en Anaerobiosis	
		UFC/g de mtra.	35°C UFC	25°C UFC	Identificación de mesofilos	MC	AST	AS
T1	1.08	2.6 x 10 ⁷	20	7	SC	SC	Lactobacilos	Flora Normal
T1	1.06	2.5 x 10 ⁷	28	14	SC	SC	Lactobacilos	Lactobacilos
T1	1.11	5.0 x 10 ⁶	Incontables	37	SC	SC	Lactobacilos	Flora Normal
T1	1.05	9.7 x 10 ⁷	Incontables	41	SC	SC	Lactobacilos	Flora Normal Lactobacilos
T1	1.05	9.7 x 10 ⁷	Incontables	99	SC	SC	Lactobacilos	Flora Normal Lactobacilos
T1	1.03	3.8 x 10 ⁵	1	0	SC	SC	SC	SC
T1	1.03	2.1 x 10 ⁷	Incontables	5	SC	SC	lactobacilos	Flora Normal
T2	1.06	3.3 x 10 ⁷	Incontables	75	SC	SC	lactobacilos	SC
T2	1.09	3.3 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	SC	Lactobacilos	Flora Normal Lactobacilos
T2	1.16	4.3 x 10 ⁷	Incontables	17	SC	SC	Lactobacilos	Flora Normal
T2	1.01	9.8 x 10 ⁶	Incontables	15	SC	SC	lactobacilos	Flora Normal
T3	1.23	1.5 x 10 ⁹	Incontables	8	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	SC	Lactobacilos	Flora Normal
T3	1.01	9.8 x 10 ⁶	1	1	SC	SC	Enterobacterias y lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T3	1.09	9.844 x 10 ⁸	Incontables	37	<i>B. subtilis</i> Y <i>B. licheniformis</i>	SC	Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T3	1.04	1.384 x 10 ⁸	62	14	<i>B. licheniformis</i>	SC	Lactobacilos	Flora Normal
T3	1.06	2.140 x 10 ⁸	Incontables	Incontables	SC	SC	Flora Normal	Lactobacilos
T4	1.04	2.658 x 10 ⁸	Incontables	59	SC	<i>E. coli</i>	Lactobacilos	Flora Normal y Lactobacilos
T4	1.03	5.00 x 10 ⁷	Incontables	155	<i>B. licheniformis</i>	SC	Lactobacilos	Lactobacilos
T4	1.01	0	135	85	SC	SC	Lactobacilos	SC
T4	1.04	4.32 x 10 ⁷	Incontables	Incontables	SC	SC	Lactobacilos	Flora Normal

NMP = Número más probable; **UFC**= Unidades formadoras de colonia; **SC**= Sin crecimiento; **AMC**= Mac Conkey; **AST**=Agar Soya Trypticaseina; **AS**= Agar Sangre; **T1**= Grupo Control; **T2**= *S. cerevisiae*; **T3**= *B.subtilis*-*B. licheniformis*; **T4**= *S.cerevisiae* y *B. subtilis*-*B. licheniformis*.

8.0 BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Alexopoulos C, Georgoulakis IE, Tzivara A, Kritas SK, Siochu A, Kyriakis SC. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and the litters. *J Anim Physiol* 2004; 88: 381-392.
- ❖ Apella M, Gonzalez S, Nader M, Romero N, Oliver G. In vitro studies on the inhibition of the growth of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, *J Appl Bacteriol* 1992; 73: 480-483.
- ❖ Ashlee M. Earl, Richard Losick, Roberto Kolter. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School. 2008.
- ❖ Bais, H.P. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis roots* by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol*. 2004; 134: 307-319.
- ❖ Barbosa, T.M. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol*. 2005; 71: 968-978.
- ❖ Barbosa TM, Serra CR, La Ragione RM, Woodward MJ, Henriques AO. Screening for *Bacillus* isolates in the broilers gastrointestinal tract. *Appl Envir Microbiol* 2005; 71: 968-978.
- ❖ Camacho, C. Enfermedades entéricas en los cerdos. *Mundo Avícola y Porcino* 1999; 31: 39-42.
- ❖ Carlisle GE, Falkinham Jo. Enzymes activity and antibiotic susceptibility *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Appl Envir Microbiol* 1989; 55: 3025-3028
- ❖ Castellanos, AA. Efecto de la adición de 2 probióticos y su combinación en la dieta de cerdos en Lactación sobre la productividad de la cerda y su camada. Tesis maestría en ciencias de la producción animal. Universidad Nacional Autónoma de México. Querétaro, 2008.
- ❖ Casula G, Cutting SM. *Bacillus* Probiotcs: Spore germination in the gastrointestinal tract. *Appl Envir Microbiol* 2002; 68: 23344-2352.
- ❖ Cazorla, F.M. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *J. Appl. Microbiol*. 2007; 103: 1950-1959.
- ❖ Cervantes ORA, Rodríguez SMC, Río AJ, Segura CR, Martínez AAMM, Tapia PG, y Cuaron IJA. Estudio de la microflora bacteriana intestinal dominante en cerdos de 8, 25 y 40 días, cuyas madres recibieron durante la gestación y lactancia *Saccharomyces cerevisiae* al 3 %. Memorias XXXVI Congreso AMVEC 2001.
- ❖ Chorvatovicova. Suppressing effect of glucan on micronuclei induced by Co60 in mice. *Strahlenther. Oncol* 1991; 167 (10): 612-614.
- ❖ Clements LD, Miller BS, Streips UN. Comparative growth analysis of the facultative anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Escherichia coli*. *Appl Microbiol* 2002; 25:284-286.
- ❖ Close, W.H. Producing pigs without antibiotic growth promoters. *Advances in Pork Production* 2000; 11: 47- 56.

- ❖ Cole, C.B., Fuller, R. A note on the effect of host specific fermented milk on the coliform population of the neonatal rat gur. J. Appl. Bacteriol. 1984; 56: 495-498
- ❖ Committee on Drug Use in Food Animals . Panel on Animal Health, Food Safety, and Public Health. The Use of Drugs in Food Animals: Benefits and Risks. National Research Council. National Academy Press, Washington, USA. 1999.
- ❖ Conway, P.L. Proc. VI International Symposium on Digestive Physiology in Pigs. EAAP Publication. Ban Doberan, Germany. 1994; 231-240.
- ❖ Czarnecki-Maulden, G.L. Effect of dietary modulation of intestinal microbiota on reproduction and early growth. Nestlé Purina Research J. Checkerboard Square. St. Louis USA. 2008; 70:286-290
- ❖ De Cupere F, Deprez P, Demeulenaere D, Muylle E. Evaluation of the effect of 3 probiotics on experimental *Escherichia coli* Enterotoxaemia in Weaned piglets. Zentralbl Veterinarmed 1992; 39(4): 277-284.
- ❖ Duc LH, Hong HL, Fairweather N, Ricca E, Cutting SM. Bacterial spores a vaccine vehicles. Infection and Immunity 2003; 71: 2810-2818.
- ❖ Earnshaw R. Lactic acid bacteria. Nutrition and Food Science 2-3. 1990.
- ❖ Duc LH, Hong HL, Barbosa TM, Henriques AO, Curring SM. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. Appl Envir Microbiol 2004; 70:2163-2171.
- ❖ Fall, R. A simple method to isolate biofilm- forming *Bacillus subtilis* and related species from plant roots. Syst. Appl. Microbiol. 2004; 27: 372-379.
- ❖ FAO, WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario. Canada, 2002.
- ❖ Flores, CPE. Obtención de una mutante de *B. subtilis* hiperproductora de bacitracina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios superiores Cuautitlan. Universidad Nacional Autonoma de México. 1985; 1-2
- ❖ Fuller, R. Probiotics in man and animals. J. Of Applied Bacteriology. 1989; 66: 365-378.
- ❖ Fuller, R. Probiotics. J Appl Bacteriol Symposium Suppl 1S – 2 S. 1986.
- ❖ García, GA, Infante, CL. Estudio de la colonización del tracto digestivo de las cerdas Landrace y Durac por *Sacharomyce cerevisiae* como Probiótico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 2000; 3, 8,13, 19-21.
- ❖ Garcia, BMC. Estudio de la Interacción de *Lactobacillus* y *Streptococcus* Intestinales Porcinos en la actividad de *Escherichia coli* enterotoxigénica. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México 1995.
- ❖ Green DH, Wakeley PR, Page A, Barnes A, Baccigalupi L, Ricca E, Cutting SM. Characterization of two *Bacillus* probiotics. Appl Envir Microbiol 1999; 63: 4288-4291.
- ❖ Hekmat S, McMahon DJ. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiótico food . J Dairy Scince 1992; 75(6): 1415-1422.

- ❖ Hentges D.J. Gut flora in disease resistance. In Fuller, R. (Ed.), Probiotics: The Scientific Basis. Chapman & Hall, London, 1992; 87-110.
- ❖ Hoa NT, Baccigalupi L, Huxham A, Smertenko A, Van PH, Ricca E, Cutting SM. Characterization of *Bacillus* species used for on bacteriotherapy and Bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. Appl Envir Microbiol 2000; 66:5241-5247.
- ❖ Hoa TT, Duc LH, Isticato R, Baccigalupi L, Ricca EPH, Cutting SM. Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model. Appl Envir Microbiol 2001; 67: 3819-3823.
- ❖ Holzapfel WH and Schillinger U. Introduction to pre- and probiótics. Food Research International 2001; 35: 109-166.
- ❖ Hong, H.A. The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS Microbiol. 2005; 29: 813-835.
- ❖ Hong, H. A., Duc le, H. The fate of ingested spores. In Bacterial Spore Formers: Probiotics and Emerging Applications. Horizon Scientific Press. 2004; 107-112.
- ❖ Hughes RC. Autolysis of isolated cell walls of *Bacillus licheniformis* N.C.T. 6346 and *Bacillus subtilis* Marburg strain 168. Biochem J 1970; 119: 849-860.
- ❖ Inatsu, Y. Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand Lett. Appl. Microbiol. 2006; 43: 237-242.
- ❖ Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Microbiología Médica Editorial. Manual Moderno Ed. 12ª 1987; 238-240.
- ❖ Jensen, BB. Gut environment of pigs. J. Anim. Feed Sci. 1998; 7: 45-64.
- ❖ Jonsson, E., Conway, P., Fuller, R. Probiotics for pigs. Probiotics. The Scientific Basis. Chapman & Hall, London. 1992; 259-316.
- ❖ Kornegay, E.T., Risley, C.R., Nutrient digestibilities of a cornsoybean meal diets as influenced by *Bacillus* products fed to finishing swine. J. Anim. Sci. 1996; 74:799-805.
- ❖ Lahtinen, M.G. Sampo, J. Comparison on four methods to enumerate probiótico Bifidobacteria in a fermented food product. Food Microbiology. 2006; 23: 571-577.
- ❖ Leser, T.D. Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. J. Appl. Microbiol. 2008; 104:1025-1033.
- ❖ London J. The ecology and taxonomic status of the *Lactobacilli*. Ann Res Microbiol. 1976; 30:279-301.
- ❖ Mathew AG, GW Upchurch; S.E. Chattin. 1998. Incidence of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from commercial swine farms. J. Anim. Sci. 76; 429-434.
- ❖ Mathew, A.G.; Chattin S. E.; Robbins C.M.; Goleen D. A. Effects of a direct-fed yeast culture on enteric microbial populations, fermentation acids, and performance of weanling pigs. J. Anim. Sci. 1998; 76:2138-2145.

- ❖ Melin L, Jensen-Waern M, Johannisson A, Ederoth M, Katouli M, Wallgren. Development of selected microflora and of phagocytic and killing capacity neutrophils in young pigs. *Veterinary Microbiology* 1997; 54:287-300.
- ❖ Michael J. Carlile, Sarah C. Watkinson. *The Fungi*. London Academia. 1994; 232-254.
- ❖ Muñoz N. Evaluación del probiótico alimenticio a base de *Lactobacillos* (Animal trigger) para prevención de diarreas en bovinos recién nacidos del Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca Hgo. Tesis FES-C, UNAM. 1989.
- ❖ Nader M, Apella A, Gonzalez S, Romero N, Oliver G. In vitro studies on the inhibition of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lact. acidophilus*, *J Appl Bacteriol* 1992; 73: 407-411.
- ❖ Nagorska, K. Multicellular behavior and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochim. Pol.* 2007; 54: 495-508.
- ❖ Nicholson, W.L. Ubiquity, longevity, and ecological roles of *Bacillus* SPORES. In *Bacterial Spore Formers: Probiotics and Emerging Applications*. Horizon Scientific Press. 2004; 1-15.
- ❖ Olson JE, Standing EJ, Griego-Harper N, Hoffman AO y Limper HA. Fungal-glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor release from macrophage. *American Society for Microbiology* 1996; 64 (9); 3548-3554
- ❖ Pérez MVG, Solorio LJS, Juárez A, Becerril J, Castañeda SEO, Zapata SL, Anaya EA, Angeles L, Tapia PG, Díaz OP, Coba AMA y Cuarón IJA. Comportamiento productivo y respuesta inmune de cerdas reproductoras y su progenie por la adición de *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta. Memorias 1 er Congreso Latinoamericano de Suinocultura, Foz do Iguacu Brasil, Octubre 2002: 273-274
- ❖ Pinchuk IV, Bressolier P, Verneuil B, Fenet B, Sorokulova IB, Mégraud Urdaci MC. In Vitro anti-helicobacter pylori activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001; 45:3156-3161.
- ❖ Radecki SV, Yokoyama MT. Swine nutrition. E.R. Miller; D.E. Ullrey; A.J. Lewis (eds). Butterworth Heinemann. Boston, USA. 1991; 439-447.
- ❖ Rosen G.D. Antibacterials in poultry and pig nutrition. In: *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Nutrition*. J. Wallace and A. Chesson (ed.), VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany. 1995; 143-172.
- ❖ Rudrappa T. A degradation product of the salicylic acid pathway triggers oxidative stress resulting in down-regulation of *Bacillus subtilis* biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta*. 2007; 226: 283-297.
- ❖ Sala CG. Antibacteriales de uso terapéutico: usos, mal uso y abuso. *Rev. Cien. Vet.* 1992; 8: 151-155.
- ❖ Sarwar G, Shah B, Mongeau R. Nuclei acid fiber and nutrient composition of inactiven dried food yeast products. *J. Og Food Science*. 1985; 50: 353-357.
- ❖ Solis VL. Evaluación de un Probiótico Alimenticio a base de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* para prevención de diarreas en bovinos recién nacidos del complejo agropecuario industrial Tizayuca, Hgo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. 1991; 6-9.

- ❖ Solorio LJS, Fuentes HL, Martínez BC, González JM, Tinoco OE, Granados NJI, Ciprian AC y Mendoza ES. 2007. Sensibilidad a los antibióticos de 2 productos utilizados como probióticos promotores del crecimiento en la producción porcina. Memorias XLII Congreso AMVEC 2007.
- ❖ Soriano, J. Antología de alimentación y nutrición del cerdo. Universidad Nacional Autónoma de México. 1980; 5:95-98 100-102 110-111.
- ❖ Spinosa MR, Braccini T, Ricca E, De Felice M, Morelli L, Pozzi G, Oggio MR. On the fate of ingested *Bacillus spore*. Res Microbiol 2002; 151: 361-368.
- ❖ Spriet, S.M., Decuyper, J.A., Henderickx, H.K. Effect of *Bacillus toyoi* (Toyocerin) on the gastrointestinal microflora, concentration of some bacterial metabolites, digestibility of the nutrients and the small intestinal mean retention time in pigs. Meded. Fac. Landbouwk. Riiksuniv. Gent. 1987; 52:1673.
- ❖ Swords, W.E., Wu C.C., Champlin F.R, Buddington R.K. Postnatal changes selected bacterial groups of the pigs colonic microflora. Biol Neonate, 1993; 63:193-200.
- ❖ Tam NK, Uyen NQ, Hong HA,, Duc LH, Hoa TT, Serra CR. Henriques AO, Cutting SM. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. Bacteriol 2006; 188: 2692-2700.
- ❖ Tannock GW, Fuller R, Smith SL, and Hall MA. Plasmid profiling of members of the family enterobacteriaceae, *lactobacilli* and *bifidobacteria* to study the transmission of bacteria from mother to infant. Journal of clinical Microbiology 1990; 28: 1225-1228.
- ❖ Thrton PB, Vetvitcka V, Pitman M, Goldman CR y Ross DG. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the glucan bonding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). J. Of Immunology. 1996; 156: 1235-1246.
- ❖ Topete, GR. Manual de análisis microscópicos de alimentos para animales. Asociación Mexicana de Microscopistas en Alimentos Balanceados, A.C. México, D.F. 1986; 43-45.
- ❖ Veldman A. Probiotics (Abstract). Tijdsch Diergeneesk. 1992; 117812): 3, 5-8.
- ❖ Wang, Y. Cho, J.H. Chen, Y.J. The effect of probiotic BioPlus 2B on growth performance, dry matter and nitrogen digestibility and slurry noxious gas emission in growing pigs. Livestock Science, 2008.